



SKRIPSI

ISOLASI LUPEOL DARI EKSTRAK METANOL RANTING *Garcinia balica* Miq

HUSNA ELSAVIARISTI
NRP. 1411 100 039

Dosen Pembimbing
Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2015



SCRIPT

**ISOLATION LUPEOL FROM METHANOL
EXTRACT OF THE *Garcinia balica* Miq
BRANCH**

HUSNA ELSAVIARISTI
NRP. 1411 100 039

Advisor Lecturer
Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.

CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA 2015

LEMBAR PENGESAHAN
ISOLASI LUPEOL DARI EKSTRAK METANOL
RANTING *Garcinia balica* Miq

SKRIPSI

Disusun Oleh:

HUSNA ELSAVIARISTI
NRP. 1411100039

Surabaya, 3 Februari 2015

Menyetujui,
Dosen Pembimbing


Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.
NIP. 195208 16197903 1 004

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia,

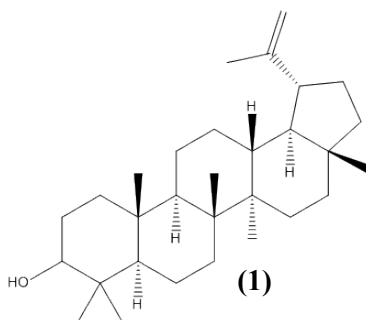

Hamzah Fansuri, M.Si., Ph.D.
NIP. 19691017 199412 1 001

ISOLASI LUPEOL DARI EKSTRAK METANOL RANTING *Garcinia balica* Miq

Nama Mahasiswa : Husna Elsaviaristi
NRP : 1411 100 039
Jurusan : Kimia ITS
Pembimbing : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.

Abstrak

Garcinia balica merupakan salah satu spesies dari famili Guttiferae yang mengandung senyawa metabolit sekunder. Senyawa golongan triterpenoid telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol pada ranting *Garcinia balica*, yaitu lupeol (**1**) berupa padatan putih dengan titik leleh 167-168°C. Metode isolasi yang digunakan yaitu Kromatografi Cair Vakum (KCV) menggunakan silika gel 60 (70-230 mesh) dielusi dengan peningkatan kepolaran pelarut. Struktur molekul dari senyawa ini telah ditetapkan berdasarkan data spektrofotometer meliputi UV, IR, NMR-1D dan NMR-2D serta dibandingkan dengan literatur. Senyawa (**1**) tidak menunjukkan potensi sebagai antioksidan ketika dilakukan pengujian menggunakan DPPH.



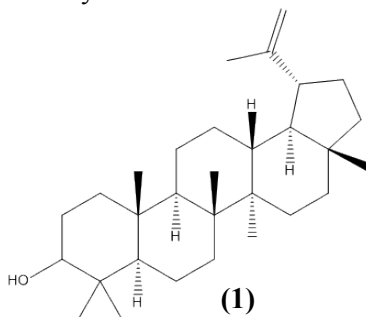
Kata kunci: *Garcinia balica*, Guttiferae, triterpenoid, lupeol

ISOLATION LUPEOL FROM METHANOL EXTRACT OF THE *Garcinia balica* Miq BRANCH

Name	: Husna Elsaviaristi
NRP	: 1411 100 039
Department	: Chemistry ITS
Advisor Lecture	: Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.

Abstract

Garcinia balica is one of species from family Guttiferae, which contain secondary metabolite compounds. Triterpenoid has been isolated from methanol extract of *Garcinia balica* branch, yield lupeol (**1**) as white solid with melting point 167-168°C. Isolation method used vacuum liquid chromatography with silica gel 60 (70-230 mesh) eluted with increasing polarity solvent. Structure of compound was elucidated by using UV, IR, NMR-1D and NMR-2D data and were compared with literature. Furthermore, compound (**1**) didn't showed potential as antioxidant using DPPH assay.



Keywords: *Garcinia balica*, Guttiferae, triterpenoid, lupeol

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Tugas Akhir yang berjudul **“ISOLASI LUPEOL DARI EKSTRAK METANOL RANTING *Garcinia balica* Miq”**.

Penyelesaian Tugas Akhir ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Taslim Ersam, MS, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses penyusunan naskah Tugas Akhir ini.
2. Hamzah Fansuri, M.Si, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia atas fasilitas yang telah diberikan hingga naskah Tugas Akhir ini dapat terselesaikan.
3. Dra, Ita Ulfin S.Si, M.Sc, selaku dosen wali atas pengarahannya dalam pengambilan mata kuliah.
4. Kedua orang tua yang senantiasa memberikan motivasi serta doa yang tulus hingga penulis dapat menjadi seperti sekarang
5. Sahabat dan *partner* saya dalam mengerjakan skripsi serta telah berbagi suka duka bersama-sama yaitu Uchik
6. Teman-teman angkatan 2011 dan Lab NPCS Kimia ITS atas semua perhatian dan dukungan serta doa selama penyusunan Tugas akhir ini

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan. Semoga Tugas Akhir ini memberikan manfaat bagi pembaca.

Surabaya, 3 Februari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Hipotesis.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani <i>G. balica</i>	5
2.2 Kandungan Kimia <i>G. balica</i>	5
2.3 Tinjauan Kimia Triterpenoid	6
2.4 Triterpenoid.....	11
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan.....	12
2.5.1 Uji DPPH.....	12
2.6 Metode Ekstraksi	13
2.7 Kromatografi.....	15
2.8 Rekristalisasi	17
2.9 Metode Uji Kemurnian.....	19
2.9.1 Uji Titik Leleh	19
2.9.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis.....	19
2.10 Penentuan Struktur	19
2.10.1 Spektrofotometer UV.....	19
2.10.2 Spektrofotometer IR	21

2.10.3 Spektrofotometer NMR	23
BAB III METODOLOGI PERCOBAAN	
3.1. Alat dan Bahan	27
3.1.2 Alat	27
3.1.2 Bahan	27
3.2 Isolasi dan Pemurnian	27
3.2.1 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder	27
3.3 Uji Kemurnian	29
3.4 Penentuan Struktur	30
3.4.1 Spektrofotometer UV	30
3.4.2 Spektrofotometer IR	30
3.4.3 Spektrofotometer ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR	30
3.5 Uji DPPH	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Ekstraksi	33
4.2 Uji Pendahuluan	33
4.3 Fraksinasi Ekstrak Metanol Ranting	34
4.4 Proses Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal	39
4.5 Elusidasi Struktur Senyawa 1	40
4.6 Aktivitas Antioksidan Senyawa 1	53
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	63
BIODATA PENULIS	71

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Pola jalur biogenesis pembentukan senyawa terpenoid dari genus <i>garcinia</i>	3
Gambar 2.1 Contoh senyawa terpenoid.....	7
Gambar 2.2 Biosintesis IPP dan isomernya DMAPP	9
Gambar 2.3 Biosintesis terpenoid.....	10
Gambar 2.4 Reaksi antioksidan dengan radikal DPPH.....	13
Gambar 2.5 Spektrum IR untuk n-propanol	22
Gambar 2.6 Harga pergeseran kimia C dan H	25
Gambar 4.1 Kromatogram pemisahan KCV 1 yang dielusi dengan MeOH:CHCl ₃ (5:95).....	35
Gambar 4.2 Kromatogram fraksi gabungan KCV 1 yang dielusi dengan MeOH:CHCl ₃ (5:95)	36
Gambar 4.3 Kromatogram pemisahan KCV 2 yang dielusi dengan heksana:etil asetat (9:1).....	37
Gambar 4.4 Kromatogram fraksi gabungan KCV 2 yang dielusi dengan MeOH:CHCl ₃ (9,8:0,2).....	37
Gambar 4.5 Kromatogram pemisahan KCV 3 dielusi dengan heksan:metilen klorida(1:9).....	38
Gambar 4.6 Kromatogram uji tiga eluen senyawa 1	40
Gambar 4.7 Spektrum UV senyawa 1	41
Gambar 4.8 Spektrum IR senyawa 1 dalam plat KBr.....	42
Gambar 4.9 Spektrum ¹ H-NMR senyawa 1	43
Gambar 4.10 Spektrum ¹³ C -NMR senyawa 1	45
Gambar 4.11 Perbandingan struktur senyawa 1 dengan Lupeol.....	48
Gambar 4.12 Korelasi HMBC senyawa 1	50
Gambar 4.13 Pemetaan senyawa terpenoid yang telah ditemukan dari genus <i>Garcinia</i>	52

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi terpenoid.....	10
Tabel 2.2 Daerah spektrum IR	21
Tabel 2.3 Daerah serapan utama IR	23
Tabel 4.1 Pengelompokan fraksi pemisahan KCV 1	34
Tabel 4.2 Pengelompokan fraksi pemisahan KCV 2	36
Tabel 4.3 Pengelompokan fraksi pemisahan KCV 3	38
Tabel 4.4 Perbandingan parsial data ^1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa 1 dengan Lupeol.....	47
Tabel 4.5 Data korelasi HMBC senyawa 1	49

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A Skema kerja	63
LAMPIRAN B Spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR	68
LAMPIRAN C Surat keterangan	70

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan adalah sumber potensial yang dapat digunakan untuk menemukan senyawa-senyawa bioaktif baru. Terutama tumbuhan yang biasa digunakan sebagai obat tradisional secara turun temurun perlu diteliti secara ilmiah khasiat dan kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan tersebut sehingga penggunaannya dapat dipertanggung jawabkan. 30.000 spesies tumbuhan dari hutan tropika yang menghuni hutan Indonesia adalah bukti bahwa Indonesia merupakan negara terkaya kedua dalam keanekaragaman hayati setelah Brazilia dan dikenal sebagai salah satu dari tujuh negara dengan keanekaragaman hayati terbesar (Lukis dan Ersam, 2010).

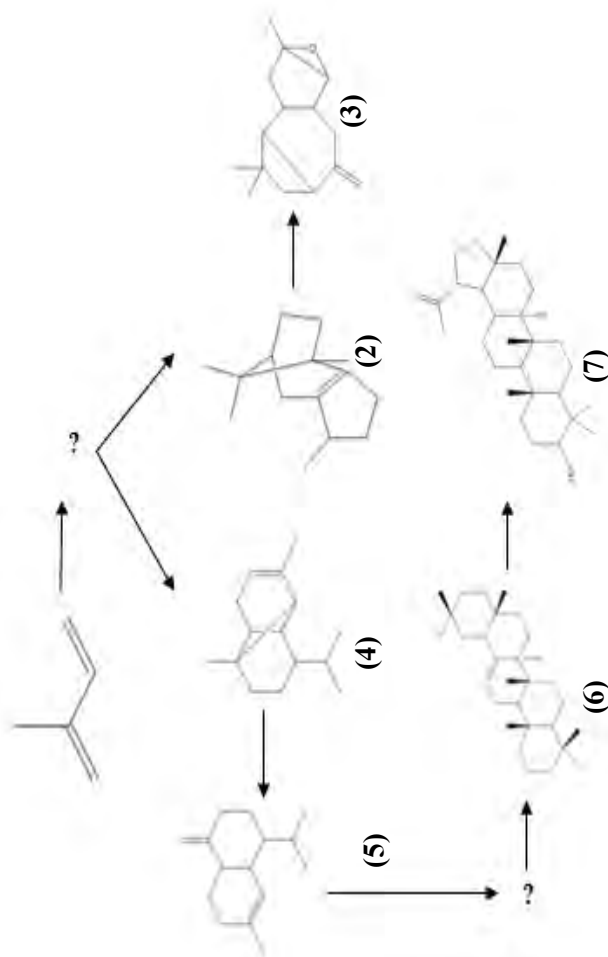
Tumbuhan mengandung senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur molekul dan aktivitas biologi yang beraneka ragam. Pada umumnya senyawa metabolit sekunder digunakan sebagai *attractant* (pemikat), *repellant* (penolak), dan *protectant* (pelindung). Senyawa metabolit sekunder bersifat sebagai antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antimalaria dan antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, dan menahan pembentukan oksigen reaktif/radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan alami lebih aman dibandingkan antioksidan sintetik yang dapat menimbulkan efek samping yang merugikan bagi kesehatan tubuh. Beberapa metode uji aktivitas antioksidan antara lain metode FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), metode penghambatan radikal superoksida, dan aktivitas penghambatan radikal hidroksil. (Achmad, *et al.*, 1995; Ersam, 2001; Rohmatussolihat, 2009; Jamil, *et al.*, 2010; Tri, 2013).

Clusiaceae adalah tumbuhan tingkat tinggi yang hidup di hutan tropis dan subtropis yang terdiri dari 40 genus dan 1000 spesies. Beberapa genus dan spesies ditemukan didaerah endemik seperti

Kielmeyera di kontinen Amerika Selatan, *Symphonia* L. dan *Pentadesma* Sabine di Afrika. Kebanyakan berbentuk pohon atau semak-semak, jarang berupa terna, mempunyai saluran resin atau kelenjar-kelenjar minyak (Tjirosoepomo dan Gembong, 2002). Selama kurang lebih dari 20 tahun, sebagian besar senyawa metabolit sekunder telah diisolasi dari tumbuhan tingkat tinggi. Penemuan ini sangat menarik bidang kemotoksik (Sultanbawa, 1979).

Salah satu spesies *Garcinia* yang merupakan tumbuhan endemik Indonesia adalah *Garcinia balica*. Tumbuhan tersebut diambil dari Taman Nasional Baluran yang terletak di wilayah Banyuputih, Situbondo, tepatnya berada di sebelah utara Kabupaten Banyuwangi. Penyelidikan kimiawi terhadap ranting tumbuhan *G. balica* telah dilakukan oleh kelompok Penelitian Aktifitas Tumbuhan ITS (PAKTI) yang sekarang telah berganti nama menjadi NPCS (*Natural Product Chemical and Synthesis*). Berdasarkan penelitian tersebut dilaporkan bahwa senyawa-senyawa aktif yang berhasil diisolasi dari bagian tumbuhan *G. balica* merupakan kelompok senyawa fenolat terutama senyawa kumarin.

Pada tahun 2010 Sri Hartati telah berhasil mengisolasi empat senyawa seskuiterpen dari ekstrak heksan kulit kayu *G. bancana* yaitu, 4,7-methanoazulene (**2**), cariofilen oxide (**3**), copaene (**4**), dan β -cadienene (**5**). Pada tahun 2010 M uharini telah berhasil mengisolasi dua senyawa triterpenoid dari ekstrak diklorometan kulit batang *G. bancana*, yaitu β -amirin (**6**) dan dari ekstrak metanol daun *G. bancana*, yaitu lupeol (**7**) (Hartati, *et al.*, 2010; Muharni, 2010).



Gambar 1.1 Pola jalur biogenesis pembentukan senyawa terpenoid dari genus *Garcinia*

Senyawa-senyawa yang telah ditemukan sebelumnya terbentuk melalui berbagai proses kimia seperti siklisasi dan oksigenasi sehingga membentuk suatu pola tertentu seperti diusulkan pada Gambar 1.1. Hal ini yang melatarbelakangi dilakukan penelitian lanjutan untuk mengisolasi senyawa-senyawa lain dari genus *Garcinia*. Senyawa-senyawa yang ditemukan akan dilakukan pengujian awal bioaktivitasnya sebagai antioksidan.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan pada jalur biogenesis dari genus *Garcinia* ternyata masih ada beberapa senyawa aktif sebagai antioksidan yang belum terekstrak. Oleh karena itu perlu ekstraksi lanjutan dari penelitian sebelumnya (Hartati dan Ersam, 2006; Mudjirahmini dan Ersam, 2007) agar diperoleh senyawa-senyawa metabolit sekunder dari ekstrak *G. balica* dan aktivitasnya sebagai antioksidan.

1.3 Hipotesis

Berdasarkan jalur biogenesis senyawa yang telah ditemukan masih banyak peluang ditemukannya senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan *G. balica* dan bersifat sebagai antioksidan.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ranting tumbuhan *G. balica* dan mengetahui aktivitasnya sebagai antioksidan.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder dari ranting *G. balica* dan diharapkan dapat meningkatkan peranan penelitian kimiawi tumbuhan dalam mengembangkan bahan-bahan berkhasiat untuk produk *supplement* biofarmaka sebagai agen antioksidan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani *G. balica*

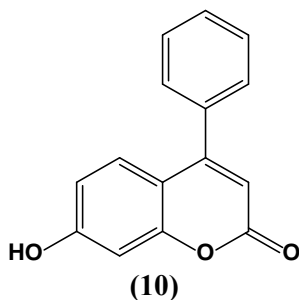
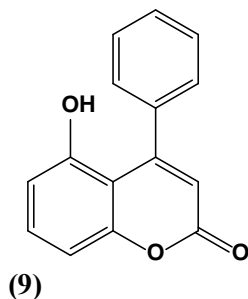
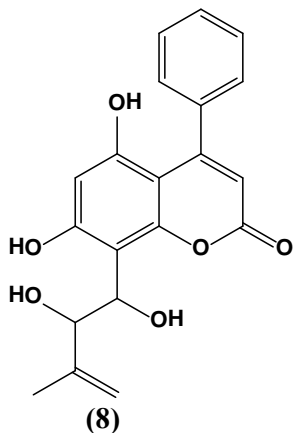
G. balica merupakan tumbuhan endemik dari Taman Nasional Baluran yang terletak di wilayah Banyuputih, Situbondo, tepatnya berada di sebelah utara Kabupaten Banyuwangi. Tumbuhan yang dikenal dengan nama mundu alas ini oleh masyarakat dibudidayakan untuk tanaman hias, buahnya dapat dimanfaatkan untuk membuat jus dan jelli. Akar dan rebusan daunnya dapat digunakan untuk meringankan gatal dan sebagai obat pelindung setelah melahirkan (Jamila, *et al.*, 2014).

Berdasarkan literatur kedudukan tumbuhan *G. balica* dalam taksonomi, maka dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Rukmana, 2003) :

Kingdom	: Plantae
Phylum	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malpighiales
Famili	: Clusiaceae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia balica</i>

2.2 Kandungan Kimia *G. balica*

Beberapa senyawa yang telah dilaporkan pada tanaman *G. balica* adalah senyawa golongan kumarin, antara lain 5,7-dihidroksi-8-(1,2-dihidroksi-3-metilbutenil-3)-4-fenilkumarin(**8**) dari bagian kulit batang, 5-hidroksi-4-fenilkumarin(**9**), dan 7-hidroksi-4-fenilkumarin(**10**) dari ekstrak etil asetat batang *G. balica* (Hartati dan Ersam, 2006; Mudjirahmini dan Ersam, 2007).

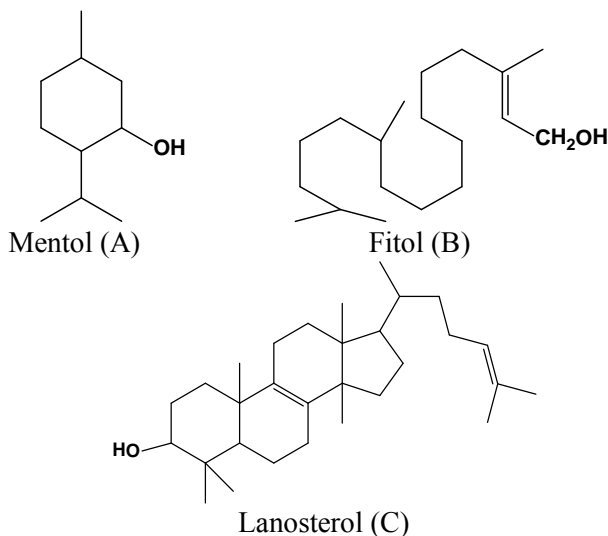


Studi literatur yang berkaitan dengan aktivitas biologinya menunjukkan bahwa senyawa 5,7-dihidroksi-8-(1,2-dihidroksi-3-metilbutenil-3)-4-fenilkumarin **(8)** memiliki aktivitas yang tinggi terhadap radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrihidrazin (DPPH). Sementara 5-hidroksi-4-fenilkumarin **(9)** dan 7-hidroksi-4-fenilkumarin **(10)** memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P. falciparum*.

2.3 Tinjauan Kimiawi Senyawa Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon teroksigenasi yang biasa ditemukan dalam minyak atsiri. Terpenoid berasal dari molekul isoprene $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ kerangka karbonnya

dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 . Berdasarkan jumlah atom C yang terdapat pada kerangkanya, terpenoid dapat dibagi menjadi hemiterpen dengan 5 atom C, monoterpen dengan 10 atom C, seskuiterpen dengan 15 atom C, diterpen dengan 20 atom C, triterpen dengan 30 atom C, dan seterusnya sampai dengan politerpen dengan atom C lebih dari 40. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan sesquiterpen yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), diterpen yang lebih sukar menguap (C_{20}), sampai ke senyawa yang tidak menguap yaitu triterpenoid dan sterol (C_{30}) serta pigmen karotenoid (C_{40}). Beberapa contoh senyawa terpenoid diberikan pada Gambar 2.1.

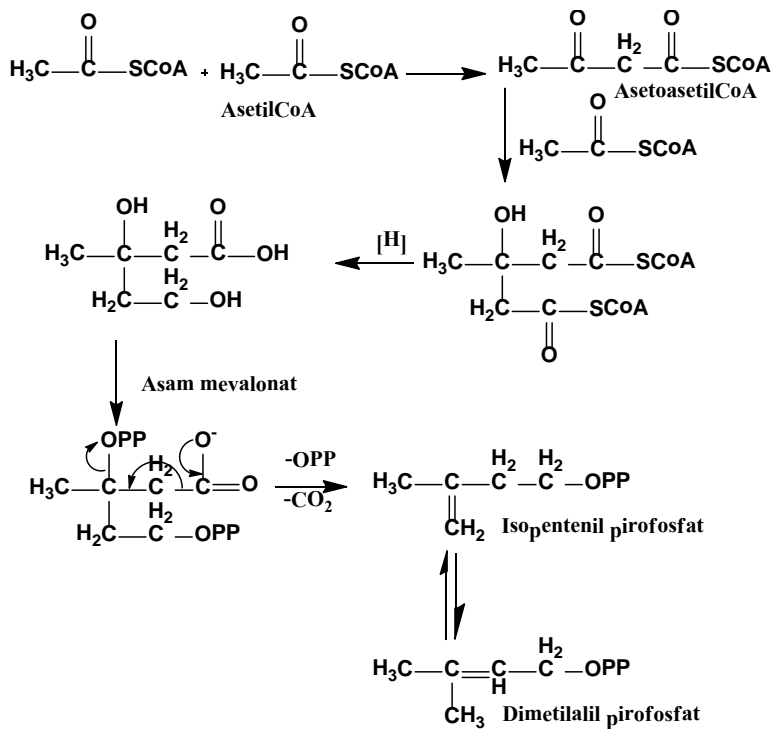


Gambar 2.1 Contoh senyawa terpenoid: monoterpen (A), diterpen (B), dan triterpen (C).

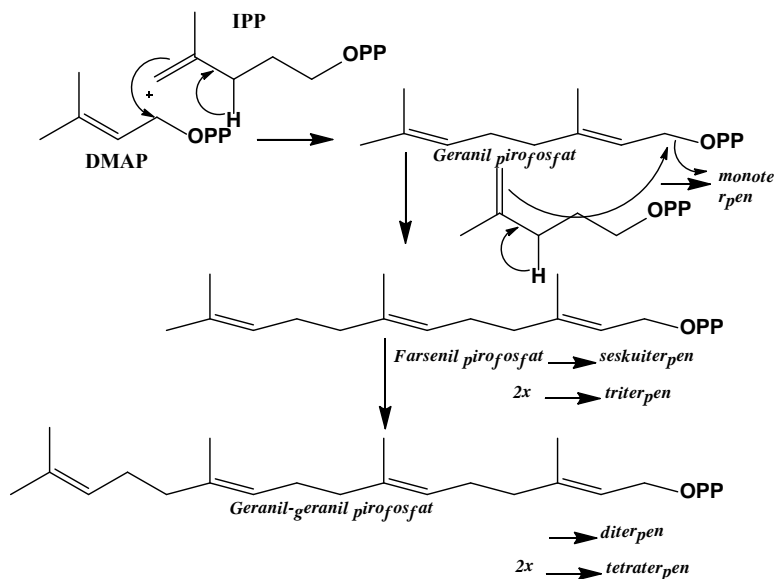
Biosintesis dari terpenoid pada tumbuhan mengikuti jalur asam asetat mevalonat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Asam asetat yang diaktifkan dengan koenzimA membentuk

asetilCoA dan melakukan reaksi kondensasi aldol dengan asetilCoA yang lain sehingga terbentuk asetoasetilCoA. AsetosetilCoA yang terbentuk juga berkondensasi dengan unit asetilCoA yang lain, sehingga terbentuk tiga unit gabungan dari asetilCoA yang selanjutnya diprotonasi membentuk asam mevalonat. Dengan adanya pirofosfat pada asam mevalonat dapat terjadi pelepasan komponen CO₂ (dekarboksilasi) dan pelepasan -OPP membentuk isopentenil pirofosfat (IPP) dengan isomernya dimetilallil pirofosfat (DMAPP) (Sjamsul, 1986; Dewick, 2009).

IPP sebagai unit isopren aktif bergabung dengan ekor DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid. Penggabungan ini terjadi karena serangan elektron dari ikatan rangkap IPP terhadap atom karbon dari DMAPP yang kekurangan elektron diikuti oleh penyingkiran ion pirofosfat. Serangan ini menghasilkan geranil pirofosfat (GPP) C₁₀ yakni senyawa antara bagi semua senyawa monoterpen. Penggabungan selanjutnya antara satu unit IPP dan GPP, dengan mekanisme yang sama seperti antara IPP dan DMAPP, menghasilkan farnesil pirofosfat (FPP) C₁₅ yang merupakan senyawa antara bagi semua senyawa seskuiterpen. Farnesil pirofosfat juga mengalami reaksi adisi dengan satu unit IPP membentuk geranil-geranil pirofosfat (GGPP) C₃₀ seperti yang terlihat pada Gambar 2.3 (Sjamsul, 1986; Dewick, 2009).



Gambar 2.2 Biosintesis Isopentenil Pirofosfat (IPP) dan isomernya Dimetilalil Pirofosfat (DMAPP).



Gambar 2.3 Biosintesis terpenoid

Secara umum terpenoid terdiri dari unsur-unsur C dan H dengan rumus molekul umum $(C_5H_8)_n$. Klasifikasi senyawa terpenoid tergantung pada nilai n , seperti yang disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi Terpenoid

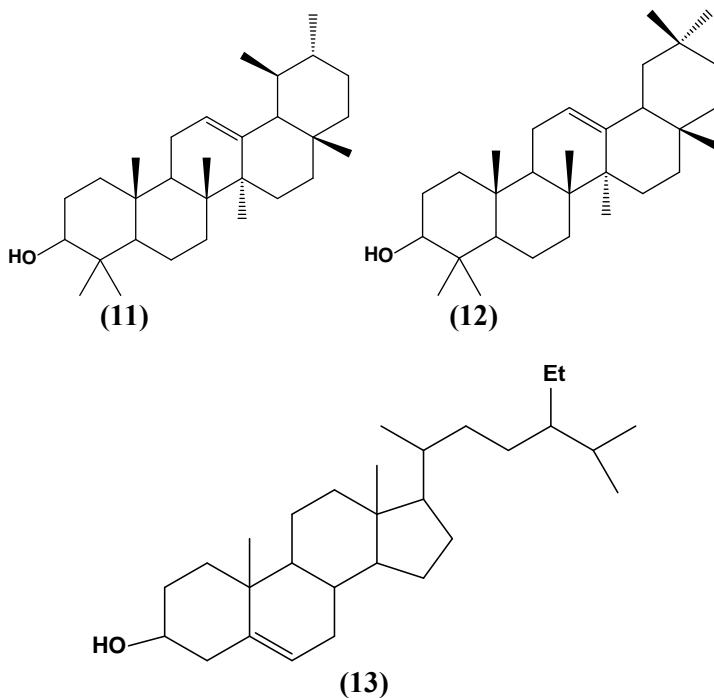
Nama	Rumus	Sumber
Monoterpen	$C_{10}H_{16}$	Minyak Atsiri
Seskuiterpen	$C_{15}H_{24}$	Minyak Atsiri
Diterpen	$C_{20}H_{32}$	Resin Pinus
Triterpen	$C_{30}H_{48}$	Saponin, Damar
Tetraterpen	$C_{40}H_{64}$	Pigmen, Karoten
Politerpen	$(C_5H_8)_n$	Karet Alam

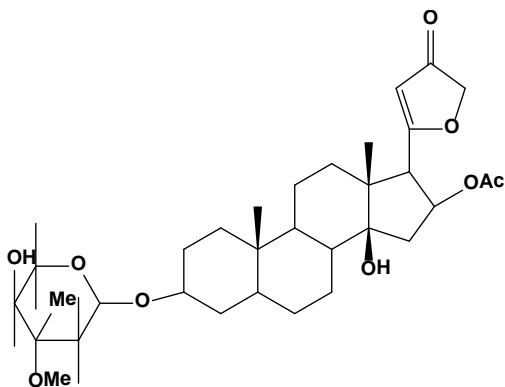
(Sjamsul, 1986)

2.4 Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang rumit, kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Secara kimia, triterpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat di dalam sitoplasma (Mannito, 1992).

Triterpenoid dapat dikelompokkan menjadi empat senyawa, yaitu triterpenoid sebenarnya, misalnya senyawa triterpena pentasiklik α -amirin (**11**) dan β -amirin (**12**), turunan asam; steroid misalnya sitosterol (**13**); saponin dan glikosida jantung misalnya oleandrin (**14**) (Harborne, 1987).



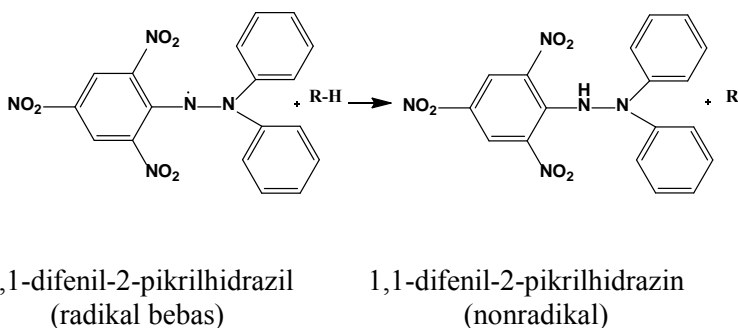


(14)

2.5 Uji Aktivitas Antioksidan

2.5.1 Uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Salah satu metode uji aktivitas antioksidan, yaitu dengan uji DPPH. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan bebetapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 515 nm dengan warna ungu gelap. Prinsip uji DPPH adalah penghilangan warna untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung menjangkau radikal DPPH dengan pemantauan absorbansi pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer. Radikal DPPH dengan nitrogen organik terpusat adalah radikal bebas stabil dengan warna ungu gelap yang ketika direduksi menjadi bentuk nonradikal oleh antioksidan menjadi warna kuning. Reaksi antara antioksidan dengan DPPH seperti pada Gambar 2.4 (Bendra, 2012).



Gambar 2.4 Reaksi antioksidan dengan radikal DPPH

2.6 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Metode ekstraksi dapat dibedakan menjadi tiga yaitu, maserasi, sokletasi dan perkolasi.

Sokletasi adalah suatu metode atau proses pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyaringan berulang ulang dengan menggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan terisolasi. Adapun prinsip sokletasi ini yaitu penyaringan yang berulang ulang sehingga hasil yang didapat sempurna dan pelarut yang digunakan relatif sedikit. Bila penyaringan ini telah selesai, maka pelarutnya diuapkan kembali dan sisanya adalah zat yang tersari. Metode sokletasi menggunakan suatu pelarut yang mudah menguap dan dapat melarutkan senyawa organik yang terdapat pada bahan tersebut, tapi tidak melarutkan zat padat yang tidak diinginkan. Metode sokletasi seakan merupakan penggabungan antara metode maserasi dan perkolasi. Jika pada metode pemisahan minyak astiri (distilasi uap), tidak dapat digunakan dengan baik karena persentase senyawa yang akan digunakan atau yang akan diisolasi cukup kecil atau tidak didapatkan pelarut yang diinginkan untuk maserasi ataupun perkolasi ini, maka cara yang terbaik yang didapatkan untuk pemisahan ini

adalah sokletasi. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan secara berurutan pelarut – pelarut organik dengan kepolaran yang semakin meningkat, dimulai dengan pelarut heksana, eter, petroleum eter, atau kloroform untuk memisahkan senyawa – senyawa terpenoid dan lipid, kemudian dilanjutkan dengan alkohol dan etil asetat untuk memisahkan senyawa – senyawa yang lebih polar. Cara menghentikan sokletasi adalah dengan menghentikan pemanasan yang sedang berlangsung. Sampel yang digunakan dalam sokletasi harus dihindarkan dari sinar matahari langsung. Jika sampai terkena sinar matahari, senyawa dalam sampel akan berfotosintesis hingga terjadi penguraian atau dekomposisi. Hal ini akan menimbulkan senyawa baru yang disebut senyawa artefak, hingga dikatakan sampel tidak alami lagi (Christian, 2003).

Maserasi adalah metode pemisahan simplisia yang paling sederhana yaitu dengan menggunakan pelarut dengan perendaman pada temperatur ruang (kamar). Maserasi dilakukan dengan merendam simplisis dalam suatu pelarut, sehingga pelarut tersebut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif yang ada di dalam dengan di luar sel maka larutan yang pekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang ulang hingga terjadi kesetimbangan konsentrasi antara larutan diluar dan di dalam sel (Goeswin, 2007).

Perkolasi adalah metode pemisahan dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Perkolasi bertujuan supaya zat yang akan diekstrak tertarik seluruhnya dan biasanya dilakukan untuk zat aktif yang tahan ataupun tidak dengan pemanasan. Efektivitas dari metode perkolasi akan lebih besar untuk senyawa yang sangat mudah larut dalam pelarut yang digunakan (Voigt, 1995).

2.7 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan suatu komponen yang didasarkan pada distribusi pergerakan antara fasa gerak dan fasa diam untuk memisahkan komponen berupa molekul yang berada pada larutan. Fasa diam adalah fasa yang menahan komponen campuran sedangkan fasa gerak adalah fasa yang melarutkan komponen campuran. Molekul yang dianalisa terdistribusi diantara fasa diam dan fasa gerak. Ketika melewati fasa diam, molekul tersebut dan tidak bergerak ke sistem. Sebaliknya molekul tersebut akan berpindah dengan kecepatan v ketika sifatnya sama dengan fasa geraknya. Gerakan fase gerak ini mengakibatkan terjadinya migrasi differensial komponen-komponen dalam sampel. Pada prinsipnya dalam kromatografi didasarkan pada perbedaan distribusi komponen antara fasa diam dan fasa geraknya sehingga menghasilkan kecepatan migrasi yang berbeda (Ernst, 2004). Terdapat beberapa jenis kromatografi yaitu, kromatografi kolom, kromatografi cair vakum dan kromatografi lapis tipis (KLT).

Kromatografi Kolom Cair Gravitasi (KKG) adalah teknik pemisahan komponen yang didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas yang berbeda terhadap permukaan fasa diamnya. Fasa diam merupakan substrat padat yang sifatnya tidak larut dalam fasa cair, sedangkan fasa gerak adalah pelarut yang mengalir membawa komponen campuran sepanjang kolom. Fasa diam yang umum digunakan untuk KKG yaitu alumina (Al_2O_3) dan silika (SiO_2). Alumina digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa organik nonpolar dan semi polar, sedangkan silika gel berupa padatan penyerap yang umum digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa organik polar. Ada dua jenis kolom berupa tabung kaca, kecepatan pergerakan fasa gerak dapat diatur dengan mengontrol laju alirnya. Laju aliran kolom dapat ditingkatkan dengan memperluas aliran eluen di dalam kolom atau dikurangi dengan mengontrol keran. Larutan sampel diisikan kedalam kolom kemudian pelarut sebagai fasa gerak ditambahkan dari atas

kolom. Pemisahan zat terlarut akan berlangsung di pelarut yang turun ke bawah yang disebabkan oleh gaya gravitasi atau didorong dengan tekanan yang akan menyebabkan eluat bergerak melalui kolom. Selama turunnya fasa gerak, zat terlarut akan mengalami proses adsorpsi dan pemisahan berulang-ulang. Laju penurunan masing-masing zat terlarut berbeda-beda tergantung pada koefisien partisinya. Karena adanya perbedaan kepolaran maka komponen-komponen dalam senyawa akan bermigrasi melalui kolom dengan kecepatan yang berbeda-beda, sehingga komponen tersebut akan terpisah dan terkumpul pada fraksi eluat yang berbeda. (Firdaus, 2011; David, 2000).

Kromatografi Cair Vakum (KCV) adalah teknik pemisahan dengan cara memisahkan *crude extract* menjadi fraksi-fraksinya yang lebih sederhana. Pemisahan tersebut memanfaatkan kolom yang berisi fasa diam bisa berupa silika gel atau aluminium oksida dan aliran fasa geraknya dibantu dengan pompa vakum. Pemisahan senyawa pada KCV didasarkan pada kelarutan senyawa yang dipisahkan. Kolom diisi dengan campuran pelarut yang cocok melalui *increasing polarity*, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Oleh karena itu KCV menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fasa gerak (Ghisalberti, 2008).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) disebut juga kromatografi planar. Prinsip yang digunakan dalam KLT yaitu kromatografi jerap. Senyawa-senyawa dalam campuran terpisah oleh partisi antara padatan penyerap sebagai fasa diam dan pelarut sebagai fasa bergerak yang mengalir melewati padatan penyerap. Fasa diam dari KLT yaitu menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Fasa diam lainnya yang biasa digunakan yaitu alumina-aluminium oksida. Sementara fasa gerak pada KLT yaitu menggunakan campuran pelarut yang sesuai. Interaksi antara *adsorbent* dengan fasa gerak (*eluent*) sangat menentukan terjadinya pemisahan komponen. Fasa gerak akan bergerak di sepanjang fasa diam karena pengaruh

kapiler pada pengembangan secara menaik (teknik *ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (teknik *descending*). Pemilihan fasa gerak didasarkan pada *increasing polarity* yaitu dimulai dari pelarut organik yang tidak polar dan dilakukan peningkatan kepolaran. Penentuan bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimia maupun fisika. Secara kimia yaitu dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Secara fisika yaitu dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet.

Identifikasi senyawa dapat dilihat berdasarkan perbedaan warna yang telah terbentuk dari campuran atau berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna masing-masing. Jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen.

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh komponen}}{\text{jarak tempuh eluen}}$$

Nilai R_f berbeda-beda untuk setiap senyawa tertentu pada eluen tertentu. Hal tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya perbedaan senyawa dalam sampel. Senyawa yang memiliki R_f lebih besar maka kepolarannya rendah, sedangkan senyawa yang memiliki nilai R_f kecil maka kepolarannya besar. Hal tersebut dikarenakan fasa diamnya yang bersifat polar. Senyawa yang bersifat polar akan tertahan kuat pada fasa diam, sehingga mempunyai nilai R_f yang rendah (Satyajit, *et al*, 2006).

2.8 Rekrystalisasi

Rekrystalisasi adalah pembentukan kristal kembali dari larutan. Pada rekrystalisasi terjadi proses pemurnian zat padat dari campuran padatnya, zat-zat yang dilarutkan dalam suatu pelarut kemudian dikristalkan kembali. Proses rekrystalisasi bertujuan untuk mengendalikan pembentukan dan memurnikan kristal.

Rekristalisasi menggunakan prinsip perbedaan kelarutan antara zat yang akan dimurnikan dengan kelarutan zat pencampurnya. Senyawa dilarutkan dengan pelarut yang sesuai di dekat titik didih pelarut dan didinginkan untuk membentuk kembali kristal dengan cara menjenuhkannya. Syarat pelarut yang dapat digunakan dalam proses rekristalisasi antara lain :

1. Melarutkan senyawa pada titik didih pelarut tetapi sedikit atau sama sekali tidak melarutkan senyawa pada suhu kamar dan tidak bereaksi dengan senyawa
2. Pelarut yang digunakan memiliki titik didih rendah untuk dapat mempermudah proses pengeringan kristal yang terbentuk
3. Pelarut harus ekonomis dan mudah didapat
4. Pelarut campuran digunakan dengan syarat salah satu pelarut harus dapat melarutkan senyawa sedangkan yang lain sama sekali tidak dapat melarutkan dan kedua pelarut harus saling campur

Proses rekristalisasi berhubungan dengan proses pengendapan. Suatu endapan terbentuk apabila larutan bersifat terlalu jenuh dengan zat pelarutnya. Kelarutan suatu endapan adalah konsentrasi molal dari larutan jenuhnya. Kelarutan bergantung pada suhu, tekanan, konsentrasi bahan lain yang terkandung dalam larutan dan komposisi pelarutnya. Terbentuknya ukuran kristal bergantung pada laju pembentukan inti (nukleasi) dan laju pertumbuhan kristal. Jika laju pembentukan inti tinggi, maka kristal yang terbentuk banyak dan terbentuk endapan yang terdiri dari partikel-partikel kecil. Laju pembentukan inti ini tergantung pada derajat lewat jenuh dari larutan. Makin tinggi derajat lewat jenuh, maka makin besar laju pembentukan inti karena kemungkinan membentuk inti baru juga semakin besar (Futichah dan Aslina, 1998; Herutomo, 2000).

2.9 Metode Uji Kemurnian

2.9.1 Uji Titik Leleh

Titik leleh suatu zat murni adalah suatu temperatur pada tekanan 1 atmosfer dimana terjadinya keadaan setimbang antara fasa padat dan fasa cair. Titik leleh merupakan ukuran kekuatan tarik-menarik antara molekul-molekul. Semakin kuat tarikan antar molekul maka semakin tinggi titik leleh zat tersebut. Titik leleh suatu senyawa murni dapat ditentukan dengan mengamati temperatur pada saat terjadi perubahan zat dari padat ke cair. Titik leleh dan jarak titik leleh suatu padatan tergantung pada kecepatan pemanasan dan ketepatan temperatur yang digunakan. Suatu senyawa murni dalam bentuk kristal meleleh dalam jarak yang tajam, biasanya kurang dari 1°C, jika jaraknya lebih besar dari 2°C maka menunjukkan adanya pengotor. Pengotor umumnya menyebabkan penurunan titik leleh dan melebarkan jarak titik leleh. Jika dua senyawa adalah identik maka titik leleh campuran dua senyawa tersebut tidak akan lebih rendah dari pada titik leleh komponen-komponen murninya. Jika dua senyawa memiliki sifat yang tidak identik maka titik leleh campurannya akan turun dan jarak titik lelehnya akan menjadi lebar (Firdaus, 2011).

2.9.2 Uji Kromatografi Lapisan Tipis

Kemurnian suatu senyawa juga dapat dilihat dengan menggunakan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kemurnian dapat dideteksi dari jumlah noda yang ada pada plat KLT. Jika noda pada plat KLT merupakan noda tunggal maka senyawa tersebut dapat dikatakan murni. Jika noda pada KLT menunjukkan noda yang berekor maka masih ada campuran senyawa lain (Firdaus, 2011).

2.10 Penentuan Struktur

2.10.1 Spektrofotometer UV

Spektroskopi merupakan ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara cahaya dan materi. Seiring dengan

perkembangan ilmu pengetahuan spektroskopi tidak hanya memanfaatkan cahaya tampak, tetapi juga bentuk lain dari radiasi elektromagnetik dan non-elektromagnetik seperti gelombang mikro, gelombang radio, elektron, foton, gelombang suara, sinar X dan lain sebagainya.

Spektroskopi digunakan untuk mengidentifikasi suatu substansi melalui spektrum yang dipancarkan atau diserap. Spektrofotometer Ultraviolet dan Visible (UV-Vis) adalah pengukuran pengurangan berkas sinar setelah melewati suatu cuplikan. Sinar ultraviolet dan visible cukup kuat untuk menaikkan elektron valensi ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrofotometer UV-Vis mengukur secara kuantitatif jumlah sinar yang diserap oleh suatu sampel yang digambarkan oleh Hukum Lambert-Beer. Berdasarkan hukum tersebut, absorban larutan sampel sebanding dengan panjang lintasan cahaya (b) dan konsentrasi larutannya (c). Panjang gelombang yang digunakan yaitu 400-750 nm disebut sinar tampak dan 200-400 nm yang disebut spektrum ultraviolet (Creswell and Runquist, 1982).

Setiap gugus fungsi memiliki panjang gelombang maksimal yang berbeda-beda yang akan terbaca pada spektrum UV-Vis. Panjang gelombang yang diserap oleh molekul organik tergantung pada seberapa kuat elektron yang terikat. Elektron yang dipakai bersama pada ikatan σ terikat dengan kuat sehingga eksitasinya membutuhkan energi yang bersesuaian dengan panjang gelombang pada daerah ultra violet vacuum dibawah 180 nm. Elektron yang terlibat pada ikatan π pada molekul organik tidak terikat kuat seperti pada ikatan σ dan oleh sebab itu lebih mudah dieksitasi oleh radiasi, sehingga spesi-spesi dengan ikatan tidak jenuh umumnya memiliki puncak absorpsi yang bermanfaat. Gugus fungsi organik yang mengabsorb pada daerah ultraviolet dan visibel dikenal sebagai kromofor (Field, *et al.*, 2007). Dalam senyawa organik, terjadi eksitasi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ pada λ_{maks} 210-280 nm yang mengindikasikan adanya gugus kromofor yang berkonjugasi ($-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$) dan eksitasi elektron $n \rightarrow \pi^*$ pada λ_{maks} 320-400 nm yang mengindikasikan adanya gugus

heteroatom terkonjugasi seperti gugus karbonil yang tersubstitusi pada suatu ena (-C=C-C=O).

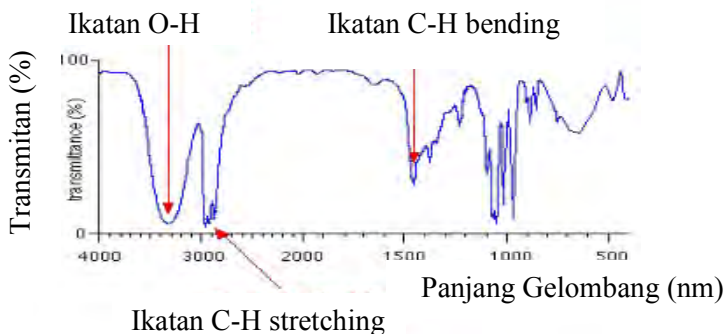
2.10.2 Spektrofotometer IR

Alat yang penting dalam kimia organik adalah spektroskopi inframerah atau IR. Spektrokopi IR digunakan untuk mengumpulkan informasi tentang struktur senyawa dan sebagai alat analisis untuk menilai kemurnian suatu senyawa. IR merupakan spektrum elektromagnetik yang terletak diantara daerah visibel dan daerah *microwave*. Daerah spektrum IR dibagi menjadi tiga yaitu jauh, dekat dan daerah pertengahan seperti pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Daerah Spektrum IR

	$\lambda, \mu\text{m}$	λ, cm^{-1}	Frekuensi (Hz)
Dekat	0,78 – 2,5	13000-4000	3,8-1,2 (10^{14})
Tengah	2,5-50	4000-200	1,2-0,06 (10^{14})
Jauh	50-1000	200-10	1,2-0,2 (10^{14})

Dalam kimia organik daerah paling banyak digunakan yaitu daerah pertengahan IR. Radiasi inframerah diserap oleh molekul organik dan diubah menjadi energi vibrasi molekul. Dalam spektroskopi IR ketika sebuah molekul organik terpapar radiasi inframerah dan energi radiasi sesuai dengan vibrasi molekul tersebut maka akan terjadi absorpsi. Berikut adalah contoh spektrum IR dari n-propanol pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Spektrum IR untuk n-propamol

Seperti yang diilustrasikan dalam spektrum n-propanol, molekul organik menimbulkan spektrum IR yang kompleks. Baik kompleksitas dan puncak panjang gelombang dalam spektrum memberikan informasi tentang molekul kimia. Daerah serapan IR terdiri dari daerah gugus fungsi yaitu pada bilangan gelombang 4000-1400 cm^{-1} yang sebagian besar merupakan daerah serapan gugus fungsi, dan daerah sidik jari (*finger print*) yaitu pada bilangan gelombang 1400-600 cm^{-1} , sebagian molekul memiliki pola unik (khas) di daerah ini. Daerah utama serapan IR digambarkan pada Tabel 2.3 (Silverstein, *et al.*, 2005; Suyatno, 2011).

Tabel 2.3. Daerah Serapan Utama IR

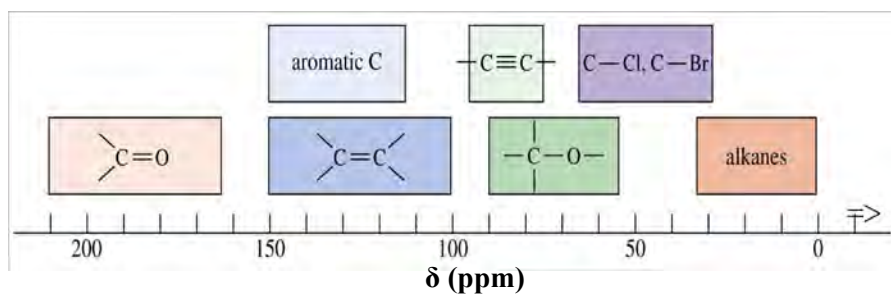
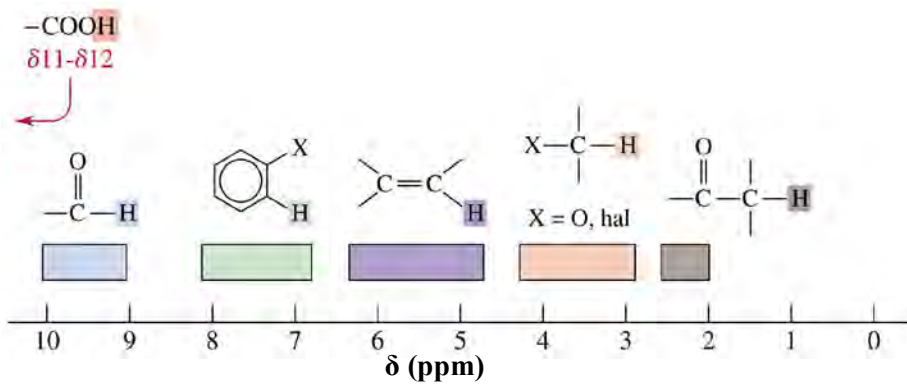
Gugus	Jenis Senyawa	Daerah Serapan (cm ⁻¹)
-C-H	Alkana	2850-2960, 1350-1470
-C-H	Alkena	3020-3080, 675-1000
-C-H	Aromatik	3000-3100, 675-870
-C-H	Alkuna	3300
-C=C	Alkena	1640-1680
-C≡C	Alkuna	2100-2260
-C=C	Aromatik (cincin)	1500-1600
-C-H	Alkana	2860-2960, 1350-1470
-C-O	Alkohol, eter, asam karboksilat, ester	1080-1300
-C=O	Aldehid, keton, asam karboksilat, ester	1690-1760
-O-H	Alkohol, fenol (monomer)	3610-3640
-O-H	Alkohol, fenol (ikatan H)	200-3600 (lebar)
-O-H	Asam karboksilat	500-3000 (lebar)
-N-H	Amina	3300-3500
-C-N	Amina	1180-1360
-C≡N	Nitril	2210-2260
-NO ₂	Nitro	1515-1560, 1345-1385

2.10.3 Spektrofotometer NMR

Ketika energi dikenai pada suatu zat, maka energi tersebut dapat diserap, diemisikan, menyebabkan perubahan kimia atau ditransmisikan. Nuklida dari suatu unsur tertentu, termasuk nuklida ¹H (proton) dan nuklida ¹³C (karbon-13), adalah nuklida yang sering digunakan dalam spektroskopi. Ketika suatu campuran mengandung proton atau karbon-13 ditempatkan pada daerah medan magnet sangat kuat dan secara bersamaan diradiasi dengan energi elektromagnetik dengan frekuensi yang tepat, maka nuklida dari campuran tersebut menyerap energi melalui suatu proses yang disebut resonansi magnetik. Energi yang terserap dapat dikuantisasi. Spektrum NMR digunakan untuk

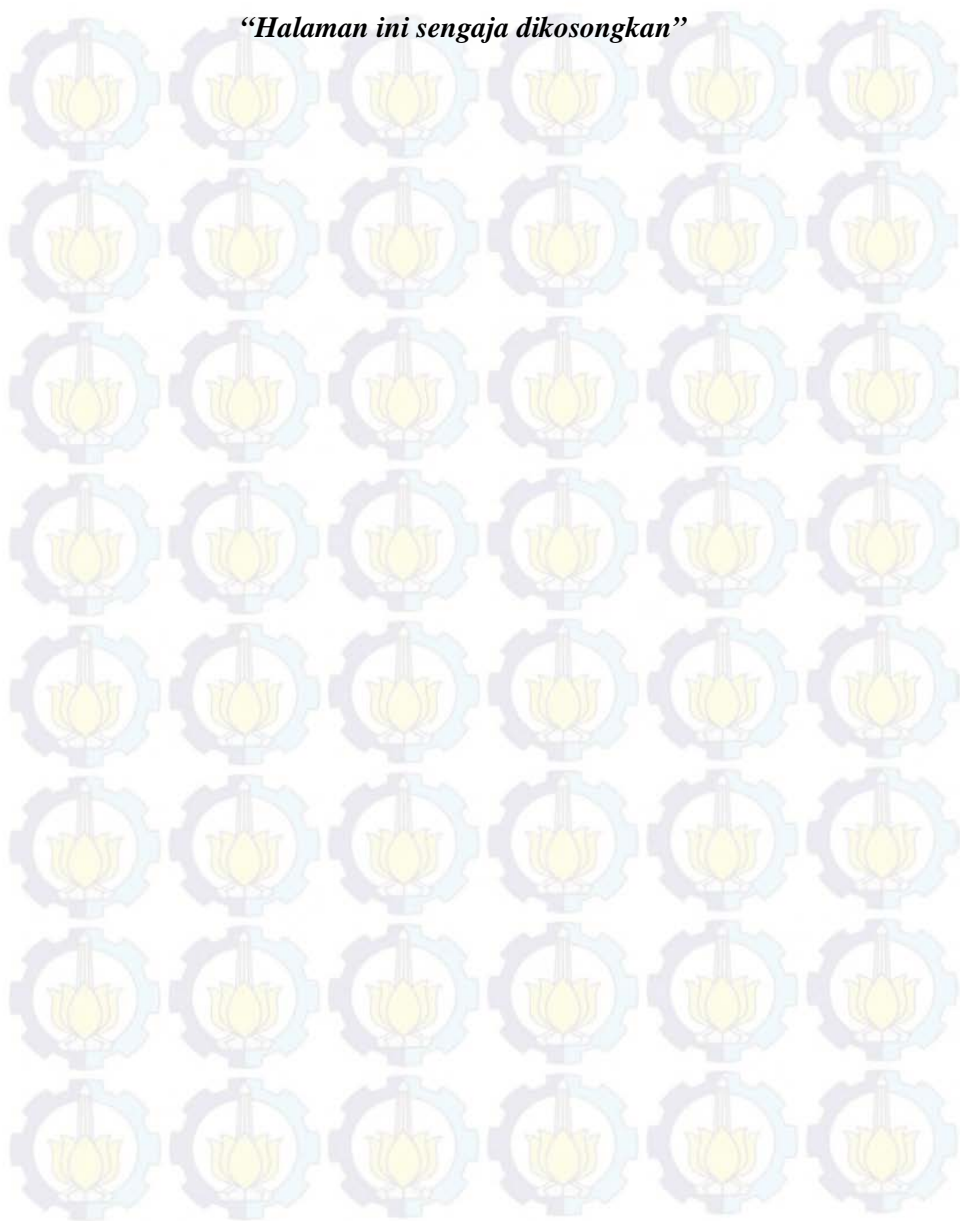
memberikan informasi tentang struktur molekul. Spektroskopi resonansi magnetik inti berpusat pada absorpsi energi gelombang radio dari molekul yang ditempatkan pada medan magnet yang sangat kuat. Inti atom yang memiliki sumbu perputaran inti akan beresonansi saat dikenai medan magnet. Setiap inti atom akan mengalami perputaran inti yang berbeda-beda sehingga akan dihasilkan puncak absorpsi yang berbeda pula. Perubahan kimia dari sinyal dalam spektra NMR tergantung pada lingkungan medan magnet dari nuklida. Lingkungan medan magnet dari nuklida dipengaruhi oleh densitas elektron dan faktor-faktor lainnya. Masing-masing sinyal NMR mengindikasikan adanya nuklida dalam lingkungan medan magnet yang berbeda. H-NMR memberikan informasi tentang jumlah setiap tipe hidrogen yang terdapat dalam suatu molekul, serta mengetahui sifat lingkungan dari setiap tipe atom hidrogen tersebut dengan membandingkan antara data referensi dengan analisis kopling tiap spin. C-NMR memberikan informasi tentang jumlah atom karbon yang terdapat dalam molekul dengan semua pergeseran kimia dan dapat mengetahui sifat lingkungannya (Hart, H., 1983).

Apabila lingkungan atom C tersebut terlindungi (shielding) akan mempunyai harga δ yang rendah, begitu juga sebaliknya. Rentang nilai pergeseran kimia untuk H-NMR sekitar 0-15 ppm, sedangkan untuk C-NMR dari 0-220 ppm seperti yang terlihat pada Gambar 2.6 (Nunuk, 2008).



Gambar 2.6 Harga pergeseran kimia C dan H

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB III METODOLOGI

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat gelas (gelas beker, gelas ukur, gelas vial kecil, gelas vial besar, erlenmeyer, labu bundar, labu ukur, dan corong kaca), bejana maserasi, *chamber* KLT, kaca arloji, pipet tetes, pipet kapiler, pinset, spatula, *hot plate*, penyaring Buchner, pompa vakum, *rotary vacuum evaporator*, timbangan digital, seperangkat alat kromatografi cair vakum (KCV), seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT), plat tetes, pipa kapiler, *Fisher John Melting Point Apparatus*, botol semprot, lampu UV 254 dan 366 nm, spektrofotometer UV, IR, ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR di Laboratorium SATREPS, Tropical Disease Center.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian ranting tumbuhan *G. balica* sebanyak 1,25 kg, NaOH, HCl, AlCl_3 , KBr, pelarut organik p.a seperti *n*-heksana, metilen klorida, kloroform, etil asetat, metanol, kloroform, akuades, kapas steril, aluminium foil, kertas saring Whatman 40, silika gel 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom, plat silika gel Merck 60 F₂₅₄ 0,25 mm ukuran 20 x 20 cm dengan aluminium sebagai fasa diam, pereaksi penampak noda serum sulfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$).

3.2 Isolasi dan Pemurnian

3.2.1 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Serbuk halus *G. balica* sebanyak 1,25 kg dimaserasi dengan pelarut metanol 3 L dalam kontainer maserator tertutup sampai seluruh bahan terendam selama 24 jam. Maserasi dilakukan selama 3 hari. Hasil ekstrak metanol diuapkan pelarutnya dengan

rotary vacuum evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol sebanyak 42,582 g.

Hasil ekstrak pekat metanol dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) agar didapatkan eluen (fasa gerak) yang sesuai untuk proses fraksinasi. Ekstrak pekat metanol sebagai sampel diambil sedikit dan dilarutkan dalam metanol. Larutan sampel ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan empat macam eluen yaitu 100% metanol, 100% etil asetat, 100% metilen klorida dan 100% heksana. KLT hasil elusi dideteksi dibawah sinar lampu UV agar diketahui pola pemisahan noda yang terbentuk. Perbandingan ini selanjutnya digunakan sebagai acuan untuk proses fraksinasi secara kromatografi cair vakum (KCV).

Ekstrak pekat metanol sebanyak 42,582 gram diimpregnasi pada silika gel 60 (70-230 mesh) selanjutnya difraksinasi dengan sistem KCV. Elusi dilakukan dengan fasa gerak yang terdiri dari 6 x 300 mL metilen klorida, 6 x 300 mL etil asetat dan 3 x 300 mL metanol. Eluat-eluat ditampung dalam vial 300 mL dan dimonitoring pada plat KLT dengan campuran eluen metanol dan kloroform (0,5:9,5). Plat KLT disemprot dengan penampak noda serum sulfat. Eluat yang memiliki harga R_f yang sama digabungkan menjadi satu fraksi. Pemisahan secara KCV ini menghasilkan 3 fraksi yakni fraksi A (vial 2), fraksi B (vial 3-13) dan fraksi C (vial 14-15). Masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya dan ditimbang. Berat masing-masing fraksi yakni fraksi A 0,7591 g, fraksi B 6,6316 g dan fraksi C 28,0092 g.

Salah satu fraksi yakni fraksi B (6,6316 g) difraksinasi lebih lanjut secara KCV dengan campuran eluen heksana dan metanol. Fraksi B diimpregnasi pada silika gel 60 (70-230 mesh) dan difraksinasi dengan fasa gerak campuran eluen heksana yang ditingkatkan kepolarannya dengan etil asetat (0; 7,5; 30; 60 dan etil asetat 100%). Hasil fraksinasi ditampung dalam vial 100 mL dan dimonitoring pada plat KLT dengan eluen campuran heksana dan etil asetat (9:1). Plat KLT disemprot dengan penampak noda serum sulfat. Eluat yang memiliki harga R_f yang sama digabungkan sehingga diperoleh 7 fraksi yaitu fraksi B1 (vial 2-

8), fraksi B2 (vial 9-10), fraksi B3 (vial 11-17), fraksi B4 (vial 18-24), fraksi B5 (vial 25-33), fraksi B6 (vial 34-40) dan fraksi B7 (vial 41-45). Masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya dan ditimbang.

Fraksi B2 (1,1569 g) difraksinasi lebih lanjut secara KCV dengan campuran eluen heksana dan metanol. Fraksi B diimpregnasi pada silika gel 60 (70-230 mesh) dan difraksinasi dengan fasa gerak campuran eluen heksana yang ditingkatkan kepolarannya dengan metilen klorida (0, 1, 2, 4, 6, 8, 20, 40 dan metilen klorida 100%). Hasil fraksinasi ditampung dalam vial 100 ml dan dimonitoring pada plat KLT dengan eluen campuran heksana dan metilan klorida (1:9). Plat KLT disemprot dengan penampak noda serium sulfat. Eluat yang memiliki harga R_f yang sama digabungkan sehingga diperoleh 10 fraksi yaitu fraksi B2.1 (vial 1-19), fraksi B2.2 (vial 20-21), fraksi B2.3 (vial 22), fraksi B2.4 (vial 23), fraksi B2.5 (vial 24-26), fraksi B2.6 (vial 27-60), fraksi B2.7 (vial 61-63), fraksi B2.8 (vial 64-65), fraksi B2.9 (vial 66-67) dan fraksi B2.10 (vial 68-70). Masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya dan ditimbang. Proses pemurnian selanjutnya dilakukan dengan metode rekristalisasi. Fraksi yang lebih murni direkristalisasi dengan pelarut yang sesuai hingga diperoleh kristal murni. Kemurnian kristal diuji dengan KLT tiga eluen dan pengukuran titik leleh. Selanjutnya dilakukan uji penentuan struktur terhadap senyawa murni dengan spektroskopi UV, IR, NMR dan HMBC.

3.3 Uji Kemurnian

Uji kemurnian kristal meliputi uji KLT tiga eluen dan pengukuran titik leleh. Eluen yang digunakan untuk uji kemurnian memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu heksana:metilen klorida (8:2), heksana:kloroform (7:3) dan heksana:etil asetat (9:1). Senyawa diidentifikasi sebagai senyawa murni jika profil noda yang dihasilkan berupa noda tunggal pada plat KLT.

Uji titik leleh senyawa murni dilakukan dengan alat pengukur titik leleh *Fisher John Melting Point*. Senyawa yang

diuji titik lelehnya diletakkan pada *object glass*. Suhu dinaikkan perlahan-lahan dan diamati perubahan fisik yang terjadi pada senyawa. Indikator senyawa murni adalah delta titik leleh ± 1 .

3.4 Penentuan Struktur

3.4.1 Spektrofotometer UV

Kristal murni yang diperoleh diambil 1 mg dan dilarutkan dengan 10 mL kloroform dalam labu ukur 10 mL. Blanko yang digunakan terdiri dari kloroform sebanyak 4 ml yang dimasukkan kedalam kuvet, kemudian larutan sampel diperlakukan dengan cara yang sama. Sampel diukur dengan spektrofotometer UV pada λ 230-380 nm. Larutan sampel ditambahkan 2-3 tetes NaOH sebagai reagen geser untuk melihat pergeseran puncak pada spektra. Reagen geser AlCl_3 dan HCl digunakan untuk mendeteksi adanya substitusi orto hidroksi pada senyawa.

3.4.2 Spektrofotometer IR

Analisis spektroskopi IR dilakukan dengan peralatan spektrofotometer FT/IR. Sampel murni ($\pm 1\text{mg}$) ditambahkan KBr dan digerus sampai homogen, kemudian dipadatkan dengan alat pembuat pelet sehingga menjadi pelet. Pelet sampel diletakkan dalam tempat sampel (*sample cell*) pada alat kemudian diukur serapannya pada bilangan gelombang $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

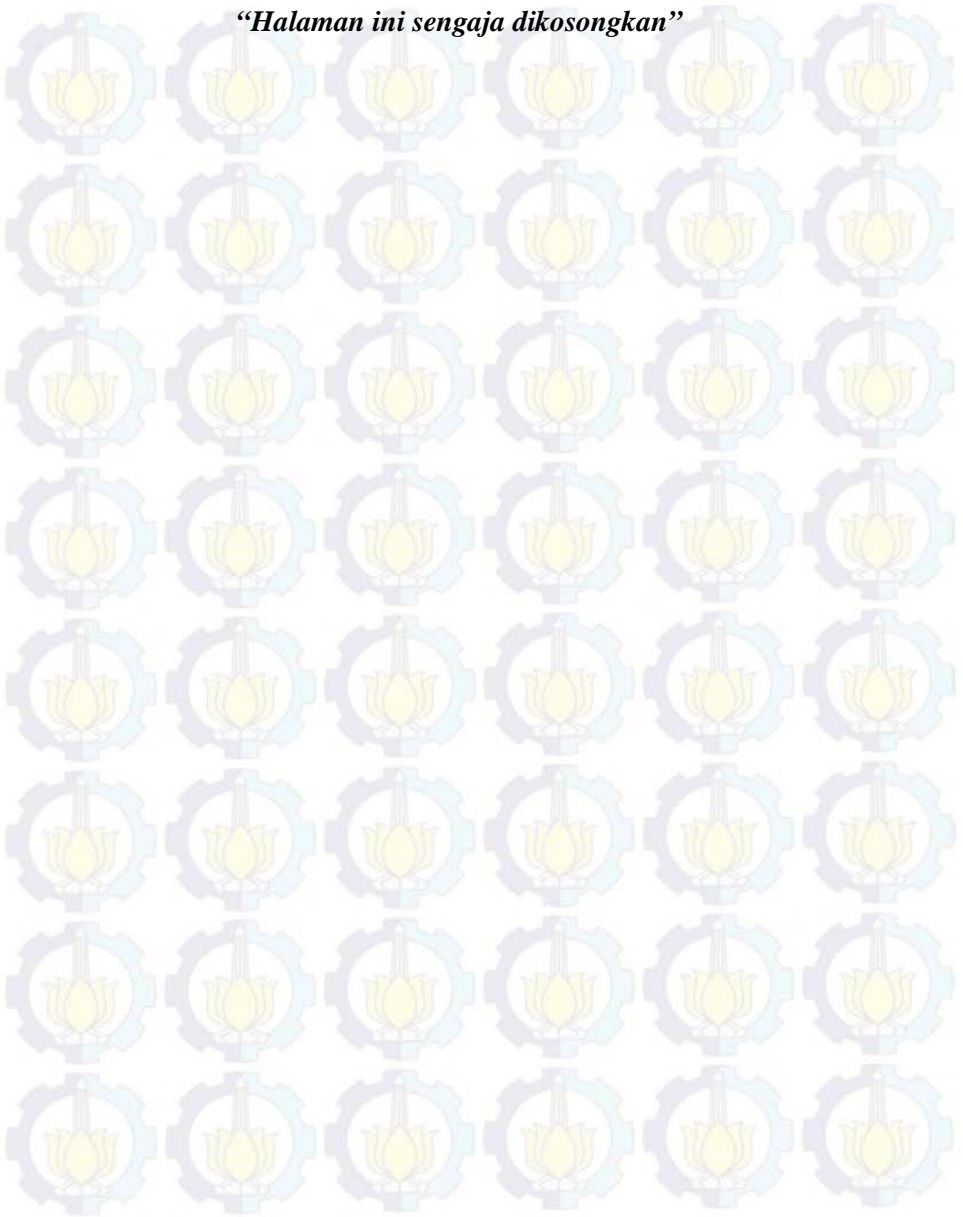
3.4.3 Spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$

Analisis spektra $^1\text{H-NMR}$ dilakukan dengan spektrometer $^1\text{H-NMR}$ 500 MHz. Sampel murni ($\pm 10\text{ mg}$) dilarutkan dengan kloroform kemudian dimasukkan dalam tabung sampel (*sample tube*) dan diletakan dalam tabung pada alat. Pergeseran kimia diukur pada 0-15 ppm. Ekspansi dilakukan pada bagian-bagian spektra yang diperlukan untuk mengetahui secara detail pergeseran kimianya. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada analisis $^{13}\text{C-NMR}$ dengan pergeseran kimia diukur pada 0-220 ppm.

3.5 Uji DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil)

Pembuatan larutan DPPH radikal $6 \times 10^{-5} \text{M}$ dilakukan dengan pelarutan 1,182 mg DPPH ke dalam 50 mL metanol. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan pelarutan 10 mg sampel ke dalam 1 mL metanol. Larutan uji dipipet 33 μL dan dimasukkan kedalam *tube* yang terlindungi dari cahaya, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH. Campuran diaduk dengan vortex mixer selama 10 detik agar menjadi homogen. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Penurunan absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 515 nm. Larutan blanko yang digunakan terdiri dari 33 μL metanol dalam 1 mL DPPH yang diukur pada panjang gelombang yang sama.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi

Sampel berupa ranting *G. balica* yang telah diperoleh terlebih dahulu dibersihkan, dirajang menjadi potongan-potongan kecil dan dikeringkan di bawah sinar matahari. Tujuan pengeringan untuk menghilangkan kadar air dari sampel. Bahan kering tersebut kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk untuk memperbesar luas permukaan dari bahan sehingga mengoptimalkan proses ekstraksi yang dilakukan nantinya.

Serbuk halus ranting *G. balica* sebanyak 1,25 kg dimaserasi dengan pelarut metanol dalam kontainer maserator sampai seluruh bahan terendam dan ditutup rapat. Metode maserasi ini dipilih karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu praktis, penggunaannya mudah, waktu yang efisien, sampel yang digunakan bisa dalam jumlah yang besar dan tidak terjadi dekomposisi senyawa-senyawa target karena dilakukan pada suhu kamar. Pelarut metanol dipilih untuk ekstraksi karena metanol merupakan pelarut universal yang baik untuk ekstraksi semua golongan senyawa metabolit sekunder (Alfinda, *et al.*, 2008).

Proses maserasi dilakukan berulang-ulang hingga 3 x 24 jam. Hal ini dilakukan untuk mengoptimalkan proses ekstraksi pada sampel tanaman. Proses maserasi dihentikan setelah warna ekstrak metanol memudar dan noda pada plat KLT tidak tajam lagi. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang dapat diekstrak oleh pelarut metanol telah hampir terekstrak semuanya. Keseluruhan ekstrak metanol yang diperoleh diuapkan sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol sebanyak 42,582 g.

4.2 Uji Pendahuluan

Sebelum proses fraksinasi dilakukan, harus dipilih terlebih dahulu pelarut yang sesuai dan memberikan hasil pemisahan yang baik. Metode yang digunakan adalah kromatografi lapis tipis (KLT). Eluen yang digunakan yaitu eluen tunggal yang memiliki

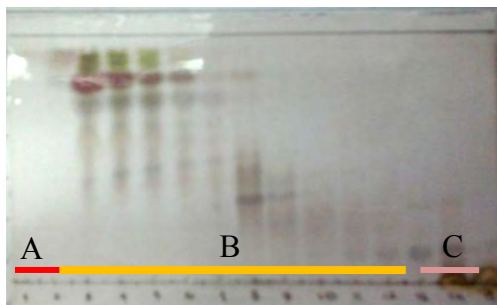
tingkat kepolaran berbeda yaitu 100% metanol, 100% etil asetat, 100% metilen klorida dan 100% heksana. Dengan dasar ini dapat dilakukan pemilihan eluen untuk proses fraksinasi terhadap ekstrak metanol dengan prinsip *increasing polarity*. Hal ini dilakukan karena kolom yang digunakan adalah silika gel yang bersifat polar. Eluen yang baik untuk proses fraksinasi selanjutnya adalah 100% metilen klorida, 100% etil asetat, dan 100% metanol. Pada kromatografi kolom, hal-hal yang paling berperan dalam keberhasilan pemisahan diantaranya adalah pemilihan adsorben dan eluen (Ghisalberti, 2008).

4.3 Fraksinasi Ekstrak Metanol Ranting

Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan eluen 100% metilen klorida, 100% etil asetat, dan 100% metanol. Pada kromatografi cair vakum, kolom dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan adsorben yang maksimum. Metode kromatografi cair vakum (KCV) ini dipilih karena pemisahannya yang lebih cepat dengan sampel yang jumlahnya relatif lebih banyak dan dapat memisahkan senyawa-senyawa target ke dalam fraksi-fraksi yang lebih sederhana. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dimonitoring pada plat KLT dengan eluen metanol dan kloroform (0,5:9,5). Pengelompokan fraksi dilakukan terhadap fraksi-fraksi yang memiliki kemiripan nilai R_f dan pola noda yang sama pada monitoring KLT. Pengelompokan ini menghasilkan tiga fraksi gabungan yang dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan performa KLT yang dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Tabel 4.1 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV I

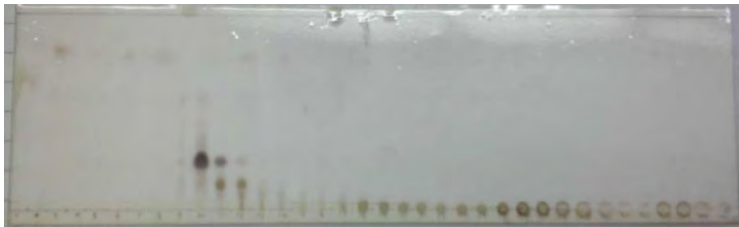
Fraksi Gabungan	No. Vial	Massa (gram)
A	2	0,7591
B	3-13	6,6316
C	14-15	28,0092



Gambar 4.1 Kromatogram pemisahan KCV I yang dielusi dengan metanol:kloroform (0,5:9,5)

Berdasarkan hasil kromatogram fraksi gabungan tersebut dapat dilihat proses pemisahan senyawa pada ekstrak metanol. Pada fraksi A merupakan kelompok fraksi yang terdiri dari senyawa-senyawa yang paling non polar. Sementara fraksi B terdistribusi secara merata dan fraksi C terdiri dari senyawa yang memiliki kepolaran yang tinggi.

Fraksi **B** (6,6316 g) difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dan dielusi dengan eluen heksana:etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya (0, 7,5, 30, 60 dan 100%). Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dimonitoring dengan plat KLT. Noda dideteksi dengan lampu UV kemudian disemprot dengan penampak noda serum sulfat yang memperlihatkan kromatogram seperti Gambar 4.2. Senyawa golongan terpenoid dapat dipisahkan dengan metode kromatografi kolom vakum menggunakan silika gel atau alumina sebagai fasa diam. Untuk analisis kualitatif digunakan plat silika gel dengan eluen campuran heksana dan etil asetat atau campuran metanol-kloroform. Beberapa campuran terpenoid yang sulit dipisahkan, membutuhkan eluen lain misalnya campuran butanol- NH_4OH 2M untuk terpenoid yang memiliki gugus karboksil atau gugus gula (Afinda, 2008).

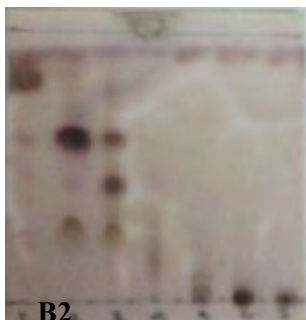


Gambar 4.2 Kromatogram pemisahan KCV II yang dielusi dengan heksana:etil asetat (9:1)

Fraksi-fraksi yang memiliki kemiripan nilai R_f dan pola noda yang sama pada monitoring KLT digabung dan didapatkan tujuh fraksi gabungan yang dapat dilihat pada Tabel 4.2. Hasil monitoring ketujuh fraksi gabungan dapat dilihat pada Gambar 4.3.

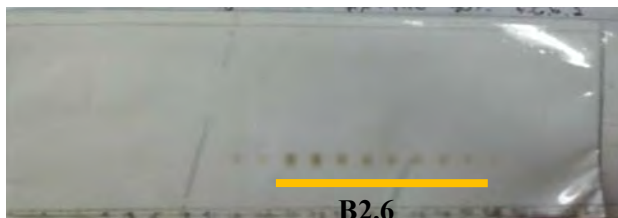
Tabel 4.2 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV II

Fraksi Gabungan	No. Vial	Massa (gram)
B1	2-8	1, 349
B2	9-10	1, 1569
B3	11-17	0,5438
B4	18-24	1,3153
B5	25-33	0,8765
B6	34-40	0,4522
B7	41-45	0,2725



Gambar 4.3 Kromatogram fraksi gabungan KCV II yang dilelusi dengan metanol:kloroform (9,8:0,2)

Frakasi **B2** (1,1569 g) difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dan dielusi dengan heksana:metilen klorida yang ditingkatkan kepolarannya (0, 1, 2, 4, 6, 8, 20 dan 40%). Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dimonitoring dengan plat KLT. Noda dideteksi dengan lampu UV kemudian disemprot dengan penampak noda serum sulfat yang memperlihatkan kromatogram seperti Gambar 4.4. Serum sulfat digunakan sebagai pereaksi semprot untuk penampak noda karena stabil dalam jangka waktu yang lama, tidak perlu dilindungi cahaya, dapat dididihkan selama waktu singkat tanpa terjadi perubahan berarti dalam konsentrasi, bersifat umum dan dapat digunakan untuk semua senyawa organik (Afinda, 2008).

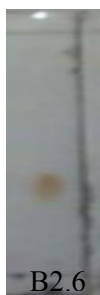


Gambar 4.4 kromatogram pemisahan KCV III dielusi dengan heksana:metilen klorida (1:9)

Fraksi-fraksi yang memiliki kemiripan nilai R_f dan pola noda yang sama pada monitoring KLT digabung dan didapatkan sepuluh fraksi gabungan yang dapat dilihat pada Tabel 4.3. Gabungan fraksi B2.6 menghasilkan noda tunggal yang dapat dilihat pada Gambar 4.5

Tabel 4.3 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV III

Fraksi Gabungan	No. Vial	Massa (gram)
B2.1	1-19	0,03
B2.2	20-21	0,1004
B2.3	22	0,0002
B2.4	23	0,1562
B2.5	24-26	0,0627
B2.6	27-60	0,7734
B2.7	61-63	0,131
B2.8	64-65	0,2177
B2.9	66-67	0,1545
B2.10	68-70	0,3366



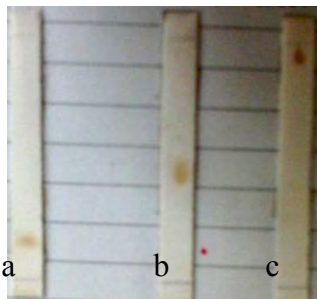
Gambar 4.5 Kromatogram fraksi B2.6 yang dilelusi dengan heksana:metilen klorida (1:9)

4.4 Proses Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal

Kontaminasi pengotor pada senyawa bahan alam yang berbentuk padat hasil isolasi dari suatu tanaman sering terjadi meski kadang-kadang hanya dalam jumlah yang relatif kecil. Untuk memurnikan dan memisahkan kristal dari pengotor-pengotornya, dilakukan rekristalisasi dengan pelarut yang dapat melarutkan kristal dengan baik. Teknik umum yang sering digunakan untuk pemurnian senyawa tersebut adalah rekristalisasi yang didasarkan pada perbedaan kelarutannya dalam keadaan panas atau dingin dalam suatu pelarut. Kelarutan senyawa dalam suatu pelarut naik seiring dengan naiknya temperatur, yang berarti bahwa kelarutan tersebut juga tinggi di dalam pelarut panas. Pembentukan kristal kembali dilakukan dengan pendinginan larutan hingga tercapai keadaan di atas jenuh. Jadi rekristalisasi meliputi tahap awal yaitu pelarutan senyawa-senyawa yang akan dimurnikan dalam sesedikit mungkin pelarut atau campuran pelarut dalam keadaan panas sehingga diperoleh larutan jernih dan tahap selanjutnya pendinginan larutan agar terbentuk kristal (Afinda, *et al.*, 2008). Berdasarkan uji kelarutan pada senyawa **1**, proses rekristalisasi dilakukan dengan pelarut kloroform dan metanol. Kristal diletakkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam kloroform sampai semua terlarut, kemudian dipanaskan dan disaring untuk memisahkan pengotor yang tidak larut. Larutan ditambahkan tetes demi tetes pelarut yang tidak melarutkan yaitu metanol sampai terjadi perubahan warna menjadi keruh. Perubahan keadaan ini menandakan bahwa larutan sudah dalam keadaan tepat jenuh atau telah mencapai kesetimbangannya. Erlenmeyer ditutup rapat agar pelarut tidak menguap dan didinginkan, tujuannya adalah untuk membentuk kristal-kristal kembali serta memisahkan kristal dari pengotornya karena pada kondisi tersebut terjadi pendinginan tiba-tiba dari suhu panas ke suhu dingin. Hasil rekristalisasi disaring vakum dan ditimbang. Padatan yang diperoleh berupa padatan putih dengan massa 773,4 mg.

Titik leleh merupakan suhu dimana fasa padat dari suatu zat berada dalam kesetimbangan dengan fasa cairnya (Chang, 2005). Senyawa yang telah murni memiliki rentang suhu dari mulai meleleh sampai meleleh seluruhnya yaitu ± 1 °C. Senyawa **1** memiliki rentang titik leleh sebesar 167-168 °C.

Selain itu untuk mengetahui suatu senyawa telah murni, dapat dilihat profil noda tunggal pada uji tiga campuran eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Dari uji tiga eluen dapat dilihat ada atau tidaknya pengotor pada senyawa tersebut. Uji tiga eluen menghasilkan nilai R_f yang berbeda sebagaimana terlihat pada Gambar 4.6 untuk senyawa **1**.



Gambar 4.6 Kromatogram uji tiga eluen senyawa **1**

Keterangan eluen:

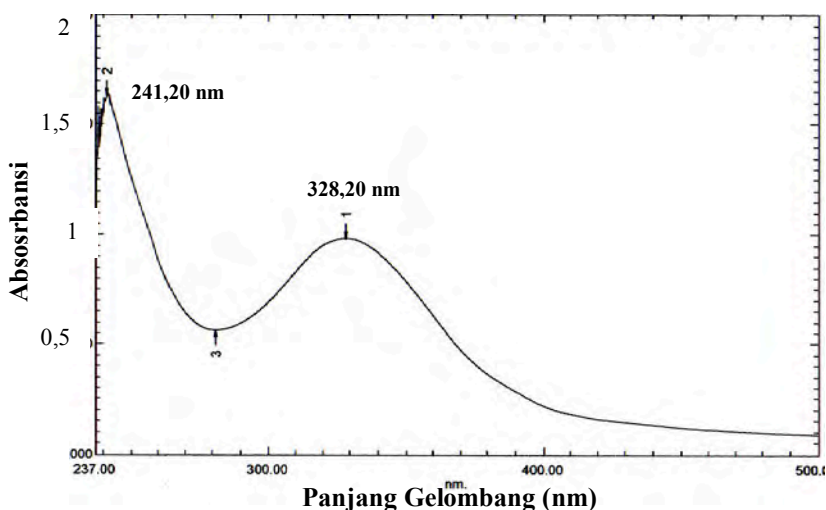
- a. Heksana : Etil asetat (1:9)
- b. Kloroform : Heksana (3:7)
- c. Heksana : Metilan klorida (8:2)

4.5 Elusidasi Struktur

Senyawa **1** berupa padatan putih sebesar 773,4 mg dengan titik leleh 167-168 °C. Analisis spektra Ultraviolet pada panjang gelombang 200-380 nm memperlihatkan adanya serapan pada panjang gelombang maksimum 241,20 nm dan 328,20 nm seperti terlihat pada Gambar 4.7.

Pada tahun 2008 Dina Wahyuningtyas telah berhasil mengisolasi senyawa alkaloid dari kulit batang *Actinodaphne*

glomerata (Blume) Nees (Medang), analisis struktur senyawa tersebut dengan spektra UV memperlihatkan adanya serapan pada panjang gelombang 220 nm dan 306 nm. Puncak serapan tersebut menunjukkan adanya eksitasi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$. Dari data spektra UV isolasi senyawa alkaloid tersebut dapat diperoleh informasi pada panjang gelombang 241,20 nm dan 328,20 nm pada senyawa **1** juga terjadi transisi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$.

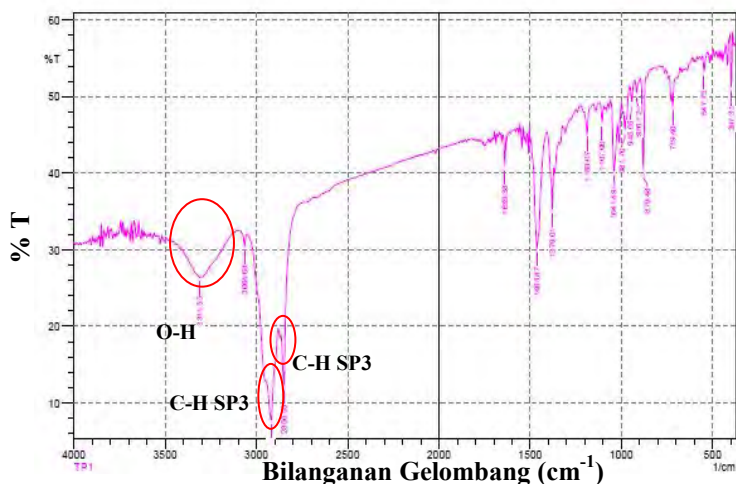


Gambar 4.7 Spektra UV senyawa **1**

Analisis spektra inframerah (IR) (KBr) pada bilangan gelombang 500-4000 cm^{-1} memperlihatkan pita-pita serapan pada 3311,55 cm^{-1} , 2920,03 dan 2850,59 cm^{-1} yang ditunjukkan pada Gambar 4.8.

Pada tahun 2008 Iwan dini telah berhasil mengisolasi senyawa turunan lupeol dari ekstrak kulit batang tumbuhan paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn.). Analisis spektra inframerah (IR) senyawa tersebut memperlihatkan pita-pita serapan pada 3444 cm^{-1} yang tajam dan cukup lebar sebagai serapan gugus

hidroksi (-OH), serapan pada 2942 dan 2862 cm^{-1} yang menunjukkan adanya C-H alifatik. Dari data spektra inframerah (IR) senyawa turunan lupeol tersebut dapat diperoleh informasi bahwa senyawa **1** memiliki gugus hidroksi (-OH) pada serapan 3311, 55 cm^{-1} dan C-H alifatik pada serapan 2920,03 dan 2850,59 cm^{-1} . Adanya gugus hidroksi (-OH) juga diperkuat dengan serapan pada 1188,07 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan C-O (Muharni, 2010).

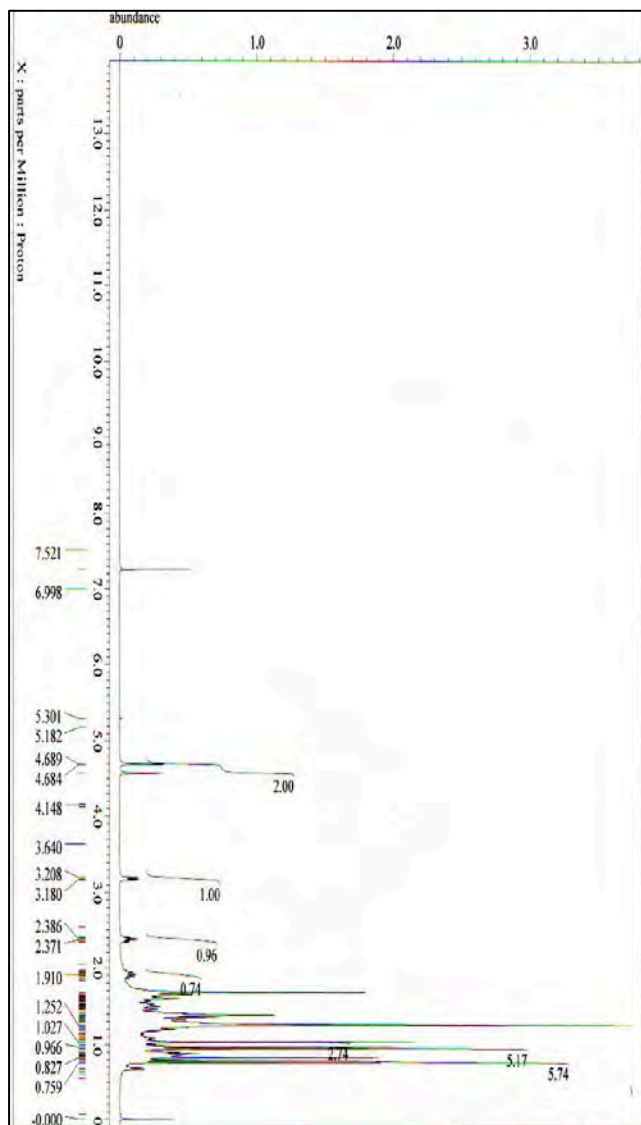


Gambar 4.8 Spektra IR senyawa **1** dalam plat KBr

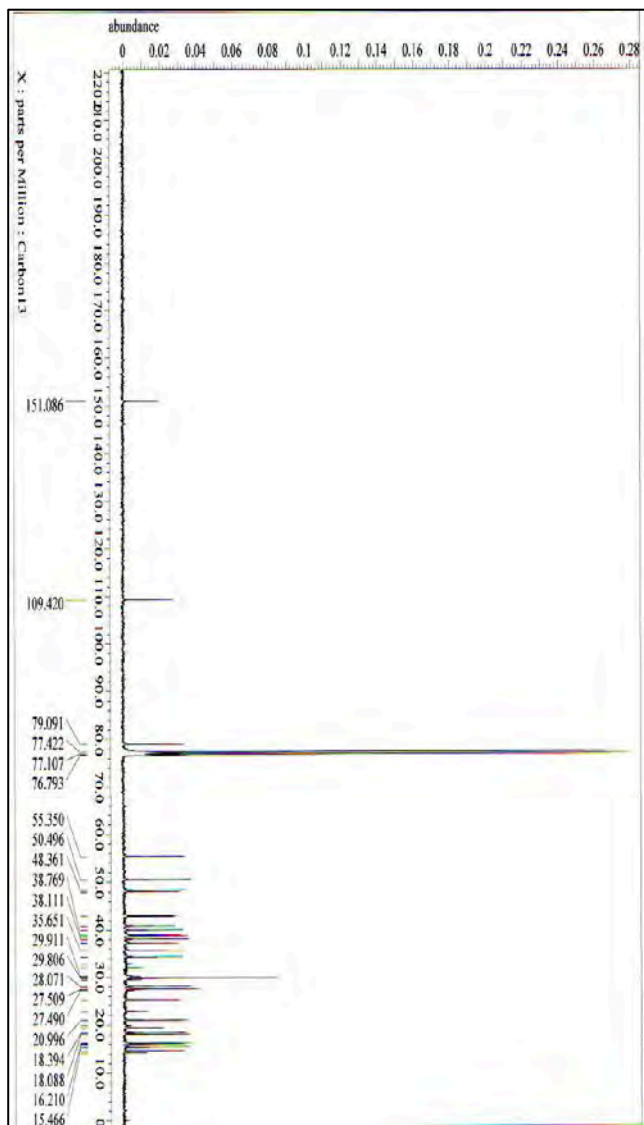
Langkah selanjutnya untuk menentukan struktur senyawa yaitu dari data pergeseran (δ) ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR. Informasi yang dapat diperoleh dari data tersebut antara lain lingkungan, jumlah (integritas), dan jenis proton maupun karbon. Pelarut yang digunakan dalam pengukuran NMR yaitu pelarut klorofom (CDCl_3), d_1 dengan frekuensi 400 MHz. Dari data pergeseran (δ) ^1H -NMR senyawa **1** yang dapat dilihat pada Gambar 4.9 dapat diperoleh informasi adanya minimal sebelas jenis proton, sedangkan dari data pergeseran (δ) ^{13}C -NMR yang dapat dilihat

pada Gambar 4.10 dapat diketahui informasi adanya 30 jenis karbon.

Gambar 4.9 Spektre ^1H -NMR senyawa 1



Spektra $^1\text{H-NMR}$ memberikan informasi tentang jumlah proton, jenis proton yang terdapat dalam suatu molekul, serta mengetahui sifat lingkungan dari setiap proton dengan membandingkan antara data referensi dengan analisis kopling tiap spin (Nunuk, 2008). Analisis spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil isolasi menunjukkan sinyal yang tidak terpisah baik pada daerah dibawah empat yang merupakan proton alisiklik dari rangka dasar terpenoid serta tidak terlihat adanya sinyal proton pada daerah aromatik. Hal ini merupakan ciri khas dari spektra $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa golongan triterpenoid (Muharni, 2010). Semakin besar keelektronegativan atom yang terikat dekat dengan proton maka akan menyebabkan proton tersebut semakin *deshielding*, sehingga pergeseran kimianya akan semakin besar (*downfield*). Sinyal pada daerah δ_{H} 4,489 dan 4,566 (1H,s) diduga merupakan sinyal dari proton metilen yang terikat pada C-29 sehingga muncul sebagai puncak singlet. Pergeseran sebesar δ_{H} 4,489 dan 4,566 dikarenakan adanya pengaruh medan anisotropi pada gugus alkena sehingga menyebabkan nilai pergeseran kimianya lebih *downfield*. Selanjutnya terlihat adanya sinyal untuk proton metin pada δ_{H} 3,18 (1H, m) yang diduga merupakan proton metin yang terikat pada C yang mengikat -OH yang terkopling dengan dua proton tetangganya dan juga terkopling dengan proton dari gugus -OH sehingga muncul sebagai puncak multiplet. Adanya gugus -OH menyebabkan nilai pergeseran kimianya lebih *downfield* karena efek elektronegativitas. Sinyal ini khas untuk triterpenoid yang mengikat -OH pada posisi C-3. Sinyal pada δ_{H} 2,38 (1H, m), merupakan sinyal dari suatu proton metin dari cincin alisiklik dari rangka triterpenoid. Pada spektra $^1\text{H-NMR}$ juga terlihat tujuh sinyal yang khas dari proton metil untuk triterpenoid pada δ_{H} 0,75; 0,78; 0,86; 0,94; 0,96; 1,02; 1,68. Ketujuh sinyal proton metil ini memiliki nilai pergeseran kimia yang lebih *upfield* dibanding dengan sinyal proton metilen yang terikat pada C-29 dan sinyal proton metin yang terikat pada C-3, karena tidak dipengaruhi oleh adanya efek medan anisotropi dan keelektronegativan.



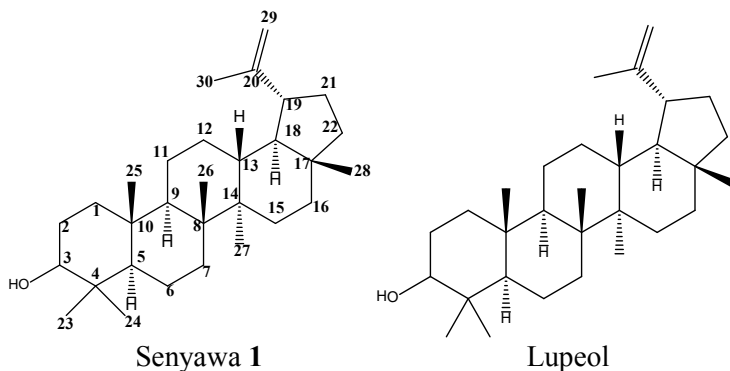
Gambar 4.10 Spektre ^{13}C -NMR senyawa **1**

^{13}C -NMR memberikan informasi tentang jumlah atom karbon yang terdapat dalam molekul dengan semua pergeseran kimia dan dapat mengetahui sifat lingkungannya (Hart, H., 1983). Dukungan selanjutnya bahwa senyawa **1** adalah suatu triterpenoid juga terlihat dari pola sinyal karbon pada spektra ^{13}C -NMR yang memperlihatkan sinyal yang bertumpuk pada daerah dibawah δ_{C} 55 ppm, serta sinyal C dari senyawa **1** yang berjumlah 30 karbon memperkuat dugaan bahwa senyawa **1** adalah triterpenoid. Pada spektra ^{13}C -NMR terlihat hanya ada dua sinyal yang muncul pada daerah > 100 ppm yaitu δ_{C} 109, 43 dan 151, 08 ppm yang mengindikasikan hanya ada satu ikatan rangkap dan tidak adanya sinyal untuk gugus C karbonil. Ikatan rangkap memiliki pergeseran kimia antara 100 hingga 150 ppm (Nunuk, 2008). Selanjutnya juga terlihat sinyal pada δ_{C} 79,09 ppm yang merupakan sinyal yang khas dari C yang mengikat -OH. Ikatan C-O memiliki pergeseran kimia antara 50 hingga 100 ppm. Dari data ini diduga senyawa **1** merupakan golongan triterpenoid yang memiliki satu ikatan rangkap terisolasi dan satu gugus -OH.

Data ^{13}C -NMR yang diperoleh senyawa **1** menunjukkan kemiripan dengan data ^{13}C -NMR dari lupeol (Muharni, 2010) yang telah dikenal sebelumnya. Perbandingan data ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR antara senyawa **1** dengan lupeol sebagai pembanding ditunjukkan pada Gambar 4.11 dan Tabel 4.4. Spektra ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa pembanding terlampir.

Tabel 4.4 Perbandingan data ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa **1** dengan Lupeol (Muharni, 2010)

C	^1H -NMR		^{13}C -NMR	
	Senyawa 1	Lupeol	Senyawa 1	Lupeol
1			38,94	38,9
2			28,0	27,6
3	3,18 (1H, m)	3,18 (1H, m)	79,09	79,2
4			38,7	39,0
5			55,35	55,4
6			18,39	18,5
7			34,3	34,4
8			40,89	40,2
9			50,49	50,6
10			37,23	37,3
11			20,99	21,1
12			25,19	25,3
13			38,1	38,2
14			43,08	43,0
15			29,9	30,0
16			35,65	35,65
17			42,89	42,89
18			48,46	48,36
19	2,38 (1H, m)	2,36 (1H, m)	48,06	48,06
20			151,08	151,08
21			27,5	27,5
22			40,08	40,08
23	0,94 (3H, s)	0,94 (3H, s)	29,8	28,1
24	0,96 (3H, s)	0,96 (3H, s)	15,46	15,5
25	0,75 (3H, s)	0,76 (3H, s)	16,04	16,1
26	0,86 (3H, s)	0,82 (3H, s)	16,21	16,3
27	0,78 (3H, s)	0,78 (3H, s)	14,62	14,7
28	1,02 (3H, s)	1,02 (3H, s)	18,08	18,1
29	4,68 dan 4,56 (1H, s)	4,68 dan 4,56 (1H, s)	109,42	109,5
30	1,67 (3H, s)	1,68 (3H,s)	19,38	19,5



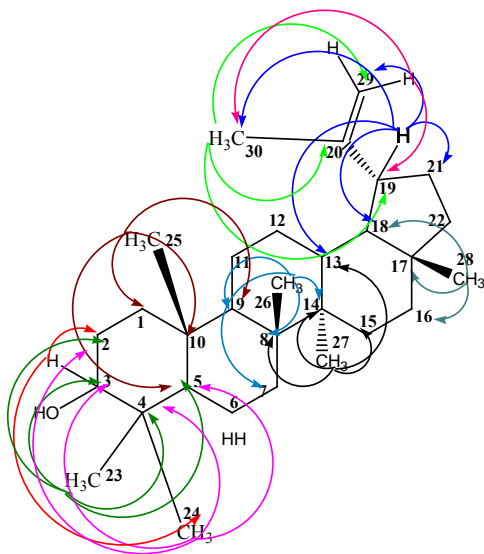
Gambar 4.11 Perbandingan struktur senyawa 1 dengan Lupeol (Muharini, 2010)

Senyawa 1 diduga sama dengan lupeol hasil isolasi dari *G. bancana*. Hal tersebut diperkuat dengan analisis lebih lanjut menggunakan pengukuran NMR dua dimensi yaitu HMBC. Korelasi HMBC memberikan informasi tentang korelasi jarak jauh antara H-C maksimal tiga ikatan melalui kontur yang meghubungkan kedua signal C dan H. Dari data HMBC diperoleh korelasi jarak jauh antara proton dengan karbon-karbon tetangga sebagaimana dalam Tabel 4.5 dan Gambar 4.12.

Tabel 4.5 Data korelasi HMBC senyawa **1**

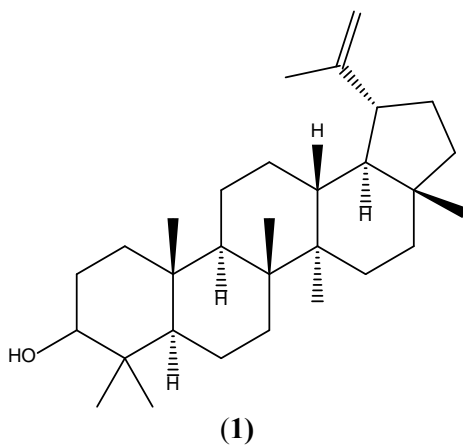
C	^{13}C (δ_{C} ppm)	^1H (δ_{H} ppm)	HMBC
1	38,94	3,18 (1H, m)	15,46; 28,0
2	28,0		
3	79,09		
4	38,7		
5	55,35		
6	18,39		
7	34,3		
8	40,89		
9	50,49		
10	37,23		
11	20,99		
12	25,19		
13	38,1		
14	43,08		
15	29,9		
16	35,65		
17	42,89		
18	48,46		
19	48,06	2,38 (1H, m)	109,42; 151,08; 19,38; 27,5; 48,46; 38,1
20	151,08		
21	27,5		
22	40,08	0,94 (3H, s)	79,09; 38,7; 55,35
23	29,8		
24	15,46		
25	16,04	0,75 (3H, s)	50,49; 37,23; 55,35

26	16,21	0,86 (3H, s)	40,89; 50,49; 34,3; 43,08
27	14,62	0,78 (3H, s)	29,9; 43,08; 38,1; 40,89
28	18,08	1,02 (3H, s)	42,89; 35,65; 48,46
29	109,42	4,68 dan 4,56 (1H, s)	19,38; 48,06
30	19,38	1,67 (3H, s)	109,42; 151,08; 48,06

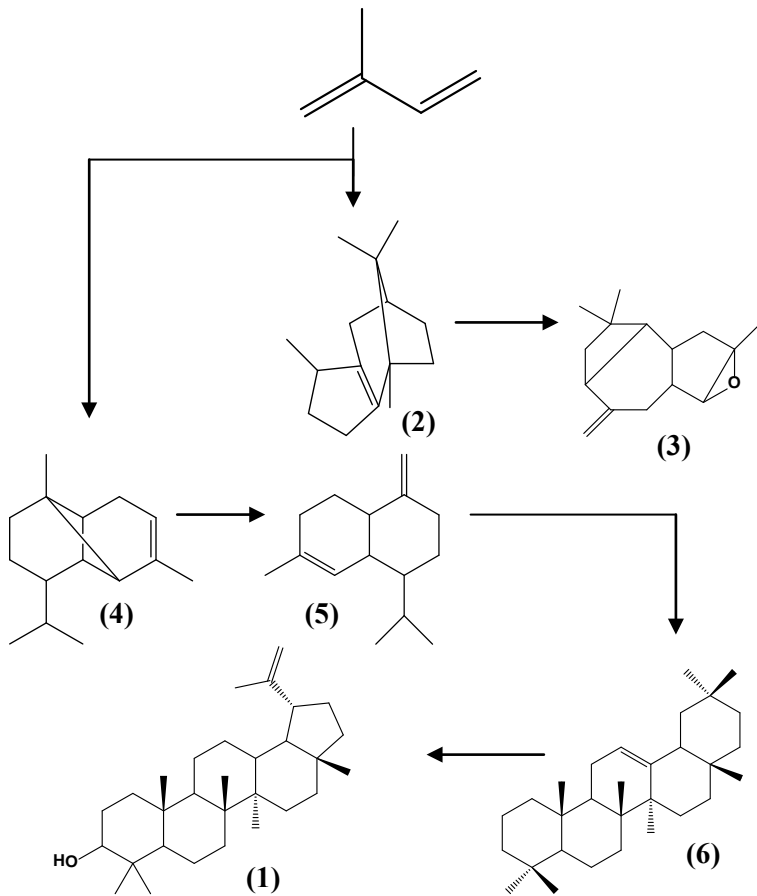


Gambar 4.12 Korelasi HMBC senyawa **1**

Dari data korelasi HMBC yang diperoleh, maka struktur senyawa **1** diberi nama Lupeol dengan struktur sebagai berikut :



Dari hasil pemetaan senyawa terpenoid yang telah ditemukan dari tumbuhan *Garcinia* maka senyawa **1** merupakan isomer dari senyawa 6 yang mengalami penambahan substituen gugus hidroksi. Atas dasar tersebut maka dapat diperoleh pemetaan senyawa **1** dengan senyawa yang telah ditemukan oleh Sri Hartati pada tahun 2010 dan Muharni pada tahun 2010 seperti pada gambar 4.13.



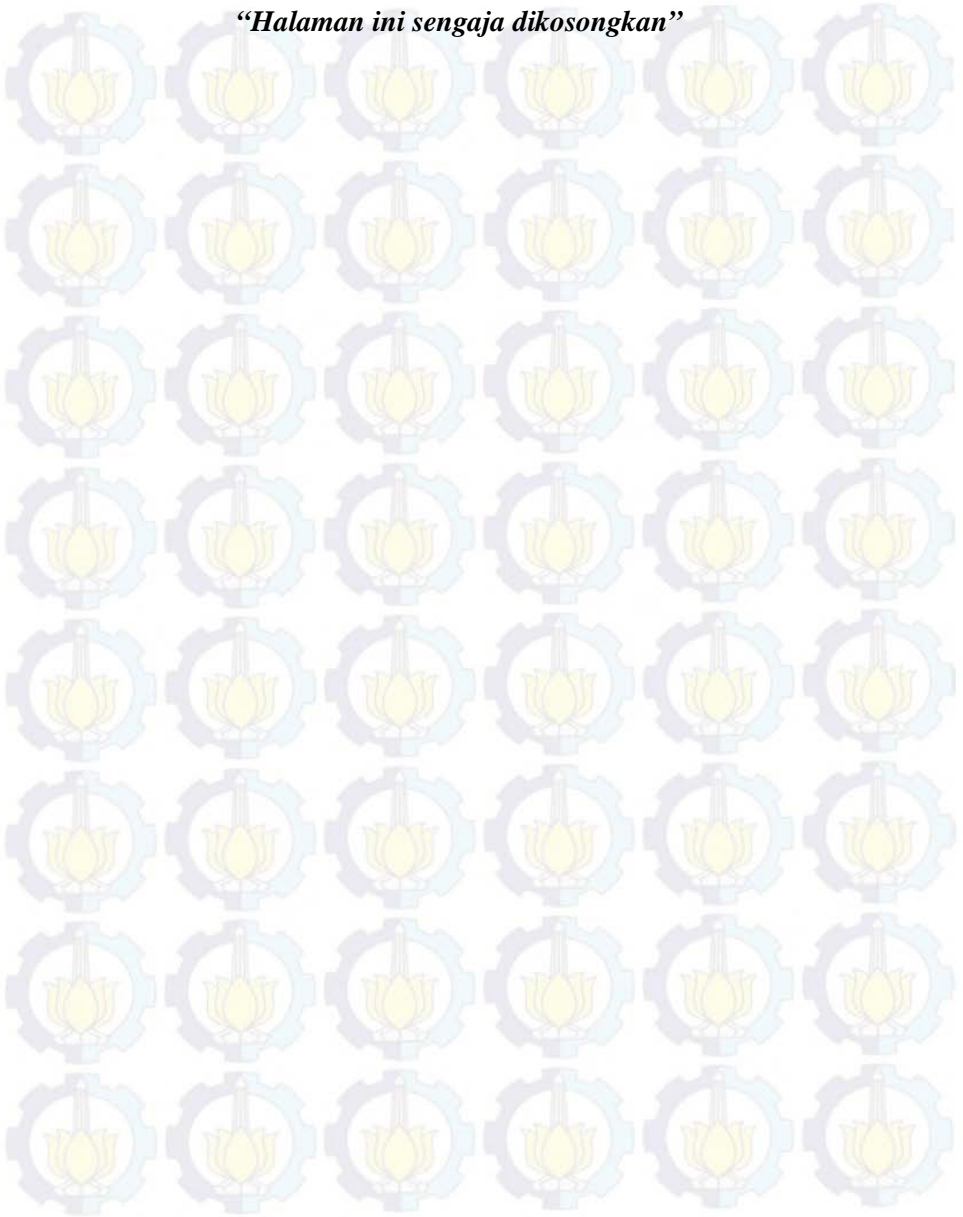
Gambar 4.13 Pemetaan senyawa terpenoid yang telah ditemukan dari genus *Garcinia*

4.6 Aktivitas Antioksidan Senyawa 1

Metode yang digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah metode perendaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH). Metode ini dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan hanya memerlukan sedikit sampel. Pada proses pengujian, zat uji akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas DPPH sehingga DPPH tereduksi menjadi senyawa nonradikal yaitu 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin yang stabil dan ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat (Bendra, 2012).

Semakin kecil absorbansi larutan uji dibandingkan dengan blanko maka semakin baik kemampuan suatu senyawa dalam meredam radikal DPPH. Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm. Hasil uji DPPH senyawa 1 yaitu tidak aktif karena selisih nilai absorbansi antara blanko dengan senyawa uji tidak jauh berbeda. Nilai absorbansi senyawa uji pada konsentrasi 319,4579 ppm sebesar 0,769 A sementara nilai absorbansi blanko sebesar 0,942 A. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa sumber antioksidan yaitu senyawa yang mengandung senyawa phenolik dalam bentuk asam phenolik, flavonoid, dan tanin. Hal ini dikarenakan adanya ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat beresonansi untuk menstabilkan radikal yang terbentuk (Rohmtussolihat, 2009). Sementara senyawa 1 tidak mengandung gugus fenol sehingga tidak berpotensi sebagai antioksidan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

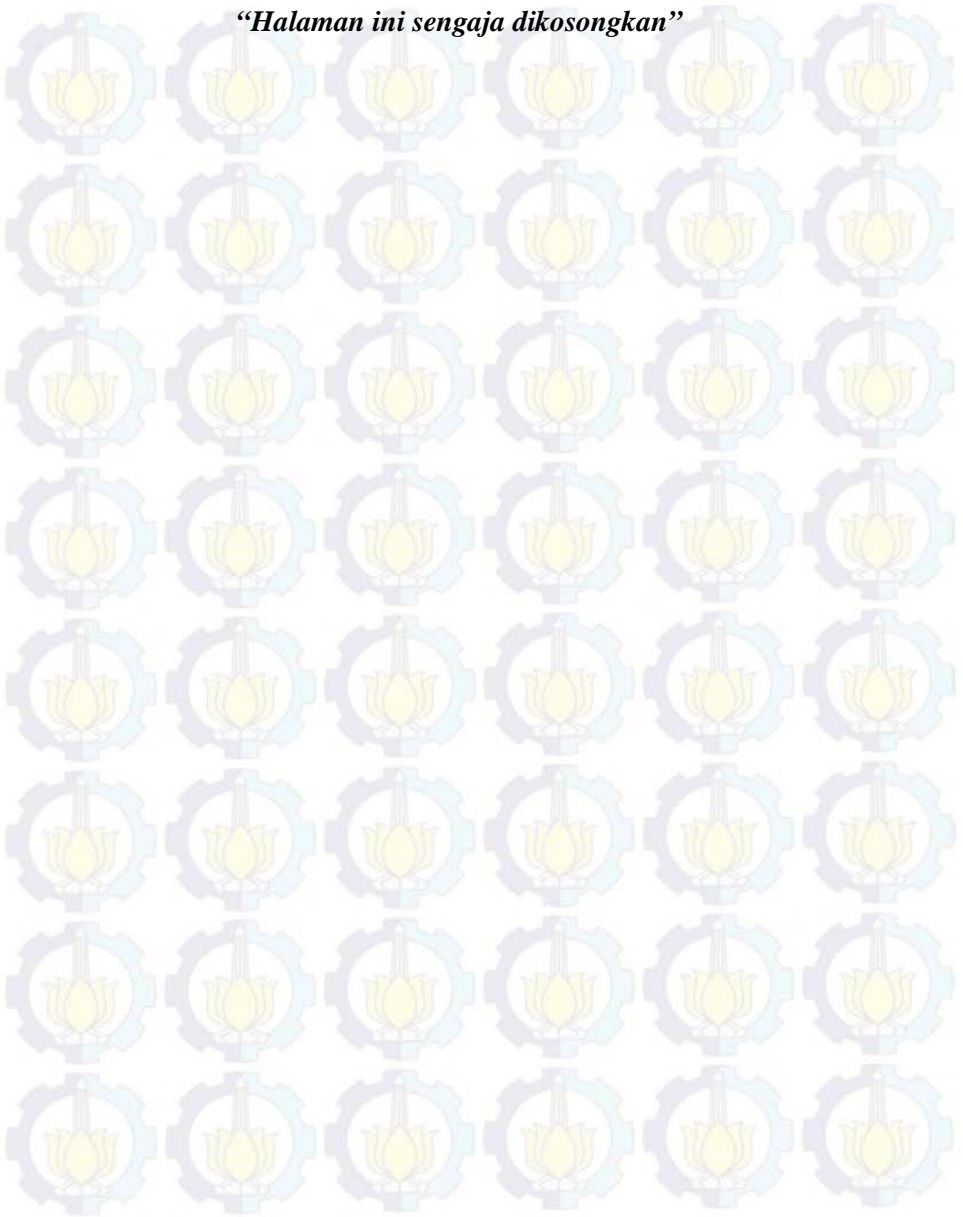
5.1 Kesimpulan

Ekstrak metanol tumbuhan manggis hutan (*G. balica* Miq.) asal Taman Nasional Baluran menghasilkan satu senyawa triterpenoid yaitu Lupeol. Lupeol tidak menunjukkan potensi sebagai antioksidan.

5.2 Saran

Fraksinasi lebih lanjut dari fraksi metanol, etil asetat, dan metilen klorida untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder lainnya dari ranting *G. balica*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR PUSTAKA

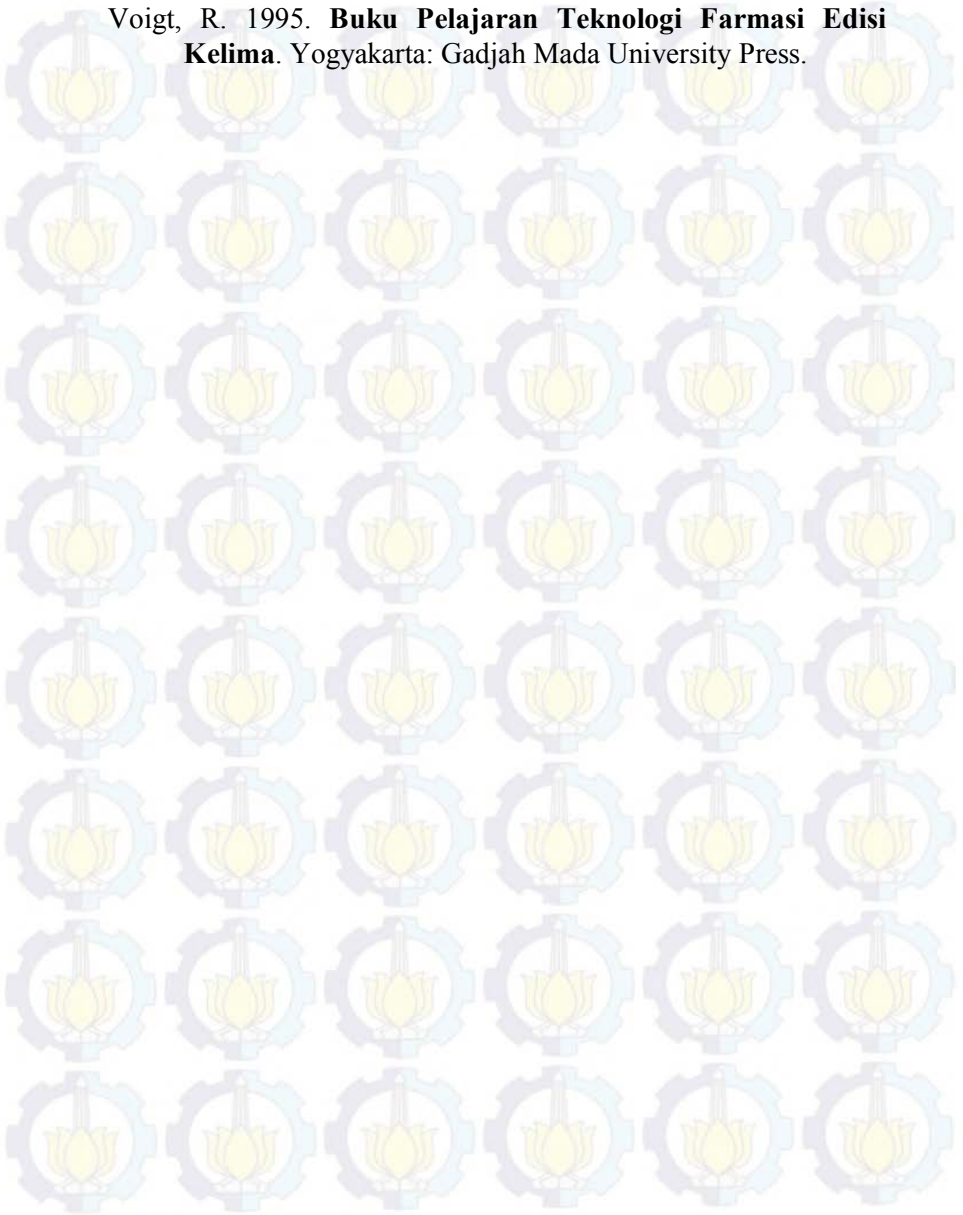
- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Juliawati, L.D., Makmur, L9., Kusuma, S., dan Sjah, Y.M. 1995. “Eksplorasi kimia tumbuhan hutan tropis Indonesia: Beberapa data mikromolekuler tumbuhan Lauraceae sebagai komplemen etnobotani”, **Prosiding Seminar Etnobotani II**, Universitas gajah Mada, Yogyakarta.
- Afinda, N., Nanik, S., Mulyadi, T., Bambang, K. 2008. **Buku Ajar Fitokimia**. Surabaya: Airlangga University Press.
- Bendra, A. 2012. “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *Premna oblongata* Miq. Dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi Teraktif”, **Prosiding Tugas Akhir**, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Chang, R. 2005. **Kimia Dasar**. Edisi ketiga. Diterjemahkan oleh Lemeda S. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Christian, G. D. 2003. **Analytical Chemistry 6th edition**. John Wiley & Sons Inc.
- Creswell, C. J. and Runquist, O.A. 1982. **Analisis Spektrum Senyawa Organik 2nd edition**. Bandung: ITB.
- David, H. 2000. **Modern Analytical Chemistry**. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Dewick, P. M. 2009. **Medical Natural Product: A Biosynthetic Approach 3rd edition**. Wiltshire: John Wiley and Sons, Inc.
- Dina, W. 2008. “Isolasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Alkaloid Dari Kulit Batabg *Actinodhaphne glomerata* (Blume) Nees (Medang)”. **Prosiding Tugas Akhir**. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

- Dini, I. 2008. "Senyawa Terpenoid Turunan Lupeol dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang Tumbuhan Paliassa (Kleinhovia hospita Linn.)". **Jurnal Chemica** 9, 26-29.
- Ersam, T., 2001. "Senyawa Kimia Mikromolekul beberapa Tumbuhan Artocarpus Hutan Tropika Sumatera Barat". Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Ernst, K. 2004. **Introduction To Chromatography**. Vienna: Institute for Analytical Chemistry University of Vienna.
- Field, L. D., Sternhell, S., & Kalman, J. 2007. **Organic Structures from Spectra 4th Edition**. John Wiley & Sons Inc.
- Firdaus. 2011. **Teknik Dalam Laboratorium Kimia Organik**. Makasar: Universitas Hasanuddin.
- Futichah dan Aslina, Br.G. 1998. "Pengaruh Perlakuan Pelarutan Padat Dan Rol Dingin Terhadap Suhu Rekristalisasi Plat Zircaloy-4". **Prosiding Presentasi Ilmiah Daur Bahan Bakar Nuklir**. Serpong: PTBN-BATAN.
- Goeswin, A. 2007. **Teknologi Bahan Alam**. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Ghisalberti, E.L. 2008. **Detection and Isolation of Bioactive Natural Products in Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**. Taylor & Francis Group Inc.
- Harborne, J.B. 1987. **Metode Fitokimia**. Bandung: ITB.
- Hart, H. 1983. **Organic Chemistry A Short Course 6th edition**. Houghton Mifflin Company, Boston.

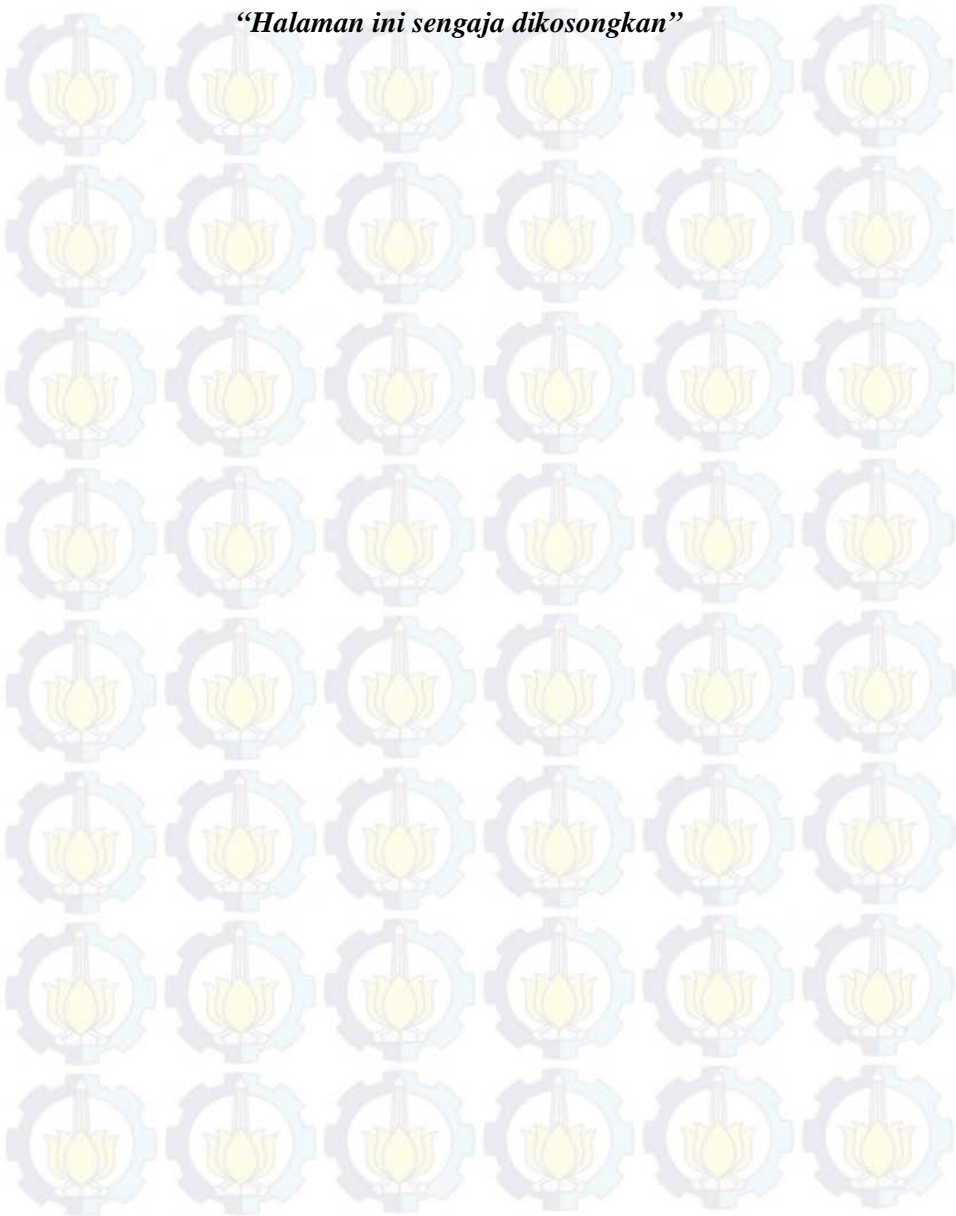
- Hartati, S dan Ersam, T. 2006. "Dua Senyawa 4-Fenilkumarin Pada Fraksi Nonpolar Ekstrak Etil Asetat Batang Garcinia Balica Miq. (Mundu Alas)". Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Hartati, S., Triyem, dan Cahyana, H. 2010. "Antioxidant Activity of Garcinia cf bancana Miq". **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention** 1, 85-91.
- Herutomo, B. 2000. "Efek Rekristalisasi Pada Bahan Bakar UO_2 Derajat Bakar Tinggi Terhadap Pelepasan Gas Hasil Fisi", *Prosiding presentasi ilmiah daur bahan nuklir V*. Pusat Pengembangan Teknologi Bahan Bakar dan Daur Ulang-BATAN.
- Jamil, D. W., dan Ersam, T. 2010. "Pelacakan Aktivitas Antikanker Terhadap Tiga Senyawa Santon Terprenilasi Dari Spesies Garcinia", **Prosiding skripsi semester gasal 2009/2010**. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Jamila, N., Melati, K., Sadiq, N.K., Naeem, K., and Hasnah, O. 2014. "Phytochemistry from the Bark of Garcinia Hombronia and Their Biological Activities". **Procedding**.
- Lukis dan Ersam, T. 2010. "Dua Senyawa Mangostin Dari Ekstrak N-Heksana Pada Kayu Akar Manggis (Garcinia mangostana, Linn.) Asal Kab. Nganjuk, Jawa Timur". **Prosiding Tugas Akhir Semester Genap 2010/2011**. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Manitto. 1992. **Biosintesis Produk Alami**. Semarang: Semarang Press.
- Mudjirahmini, D. Dan Ersam, T. 2006. "Turunan 4-Fenilkumarin dari Fraksi Polar Ekstrak Etil Asetat Pada Batang Garcina Balica Miq". **Jurnal Akta Kimindo** 3, 55-60.

- Muharni. 2010. "Triterpenoid Lupeol dari Manggis Hutan (*Garcinia bancana* Miq.)". **Jurnal Penelitian Sains** 13, 40-45.
- Muharni. 2010. "Profil Kandungan Kimia dan Potensi Tumbuhan Manggis Hutan (*Garcinia bancana* Miq.) Sebagai Sumber Senyawa Antioksidan". **Jurnal Pembangunan** 4.
- Nunuk, H. S. 2008. **Menentukan Struktur Molekul Senyawa Melalui Analisis Data Spektroskopi**. Makasar: UNHAS.
- Rohmatussolihat. 2009 "Antioksidan, Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia". **Biotrends** 4, 5-9.
- Rukmana, R. 2003. **Bibit Manggis**. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Satyajit, D.S, Zahid, L., and Alexander I.G. 2006. **Methods in Biotechnology: Natural Product Isolation 2nd edition**. Human Press Inc.
- Silverstein, R. M., Webster, F., and Kiemle, D. 2005. **Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th Edition**. John Wiley and Sons, Inc.
- Sjamsul, A. A. 1986. **Buku Materi Pokok Kimia Organik Bahan Alam Modul**. Jakarta: DEPDIKBUD UT.
- Sultanbawa, M. U. S. 1979. "Xanthonoids of tropical plants", **Tetrahedron** 36, 1465–1506.
- Suyatno. 2011. **Spektrokopi Inframerah (IR)**. Surabaya: UNESA
- Tjirosoepomo dan Gembong. 2002. **Taksonomi tumbuhan (spermathophyta)**. Yogyakarta: UGM Press.
- Tri, J. R. 2013. **Kimia Hasil Alam**. Yogyakarta: Pustaka Belajar.

Voigt, R. 1995. **Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi Kelima**. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

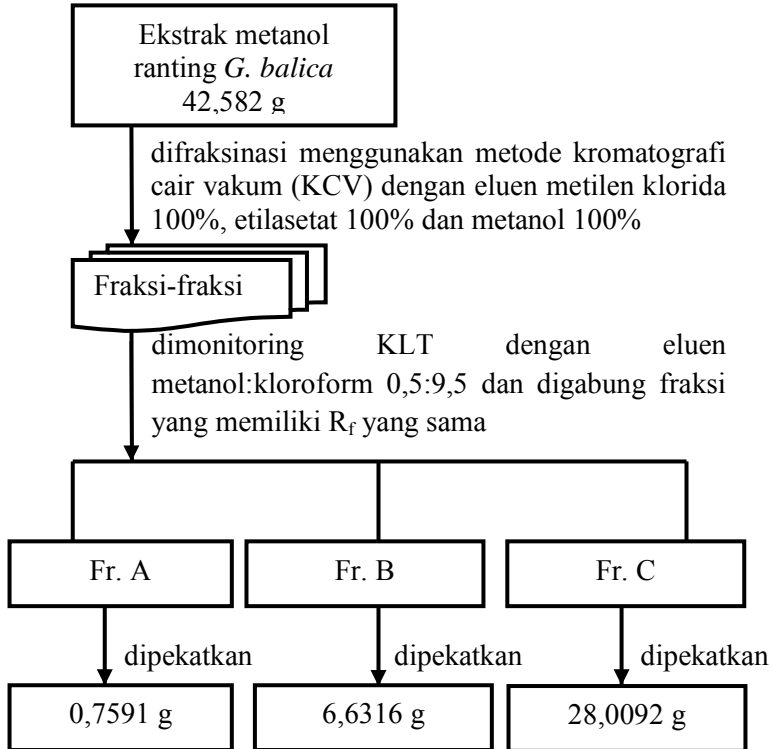


“Halaman ini sengaja dikosongkan”

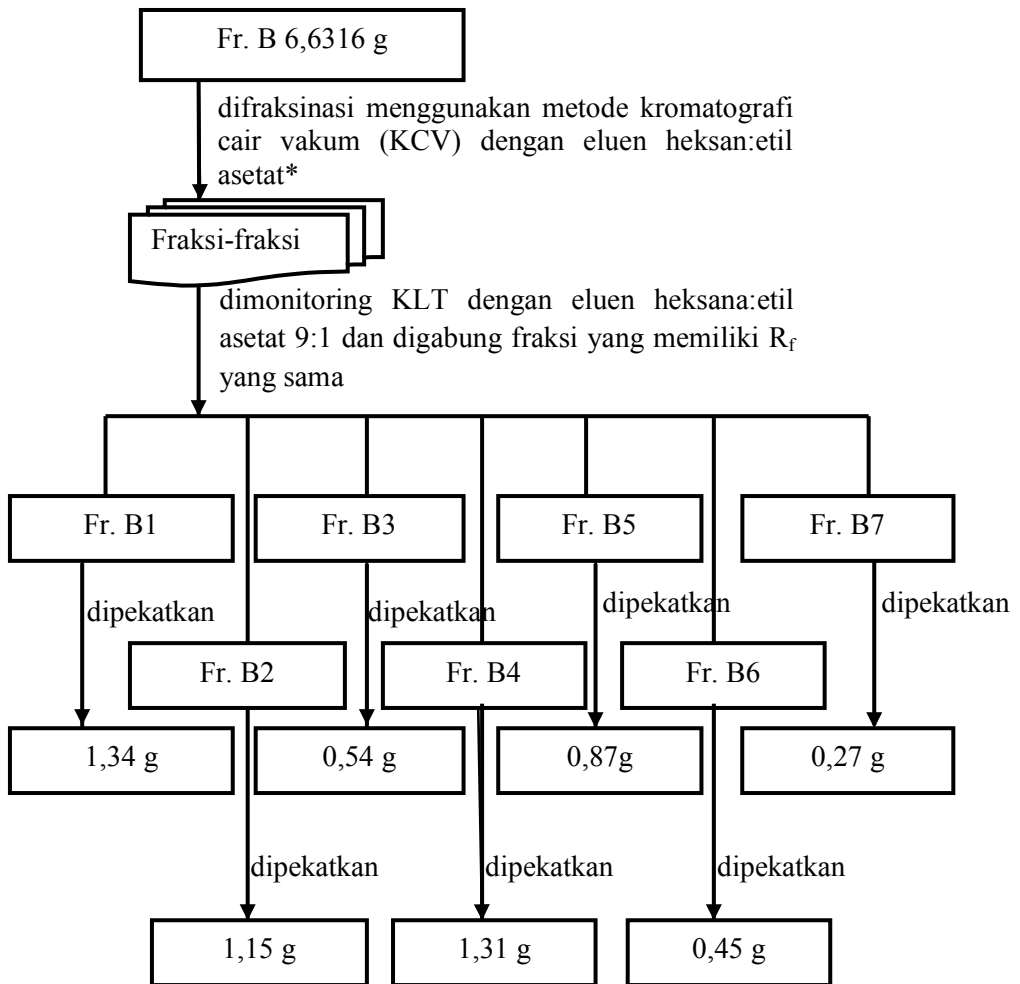


LAMPIRAN A SKEMA KERJA

1. Skema Kerja Isolasi Ekstrak Metanol *G. balica*

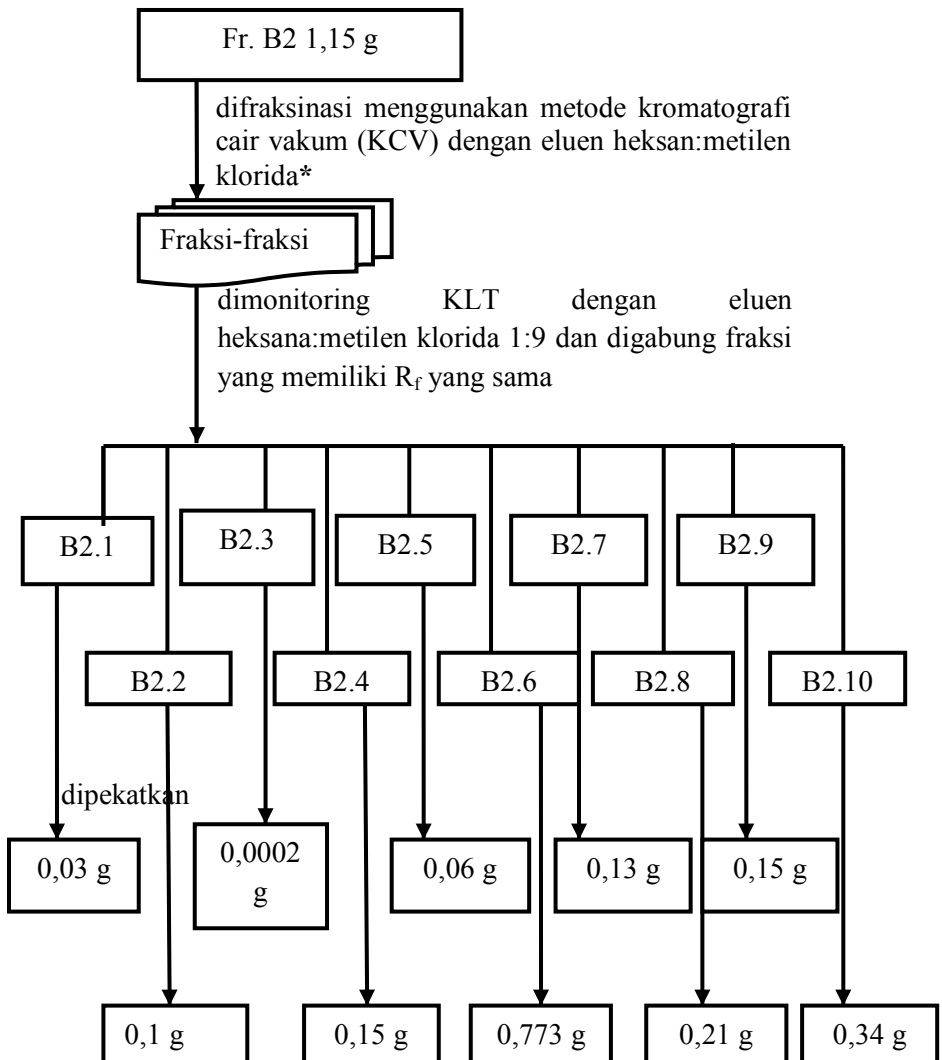


2. Skema Kerja Fraksinasi Fraksi B



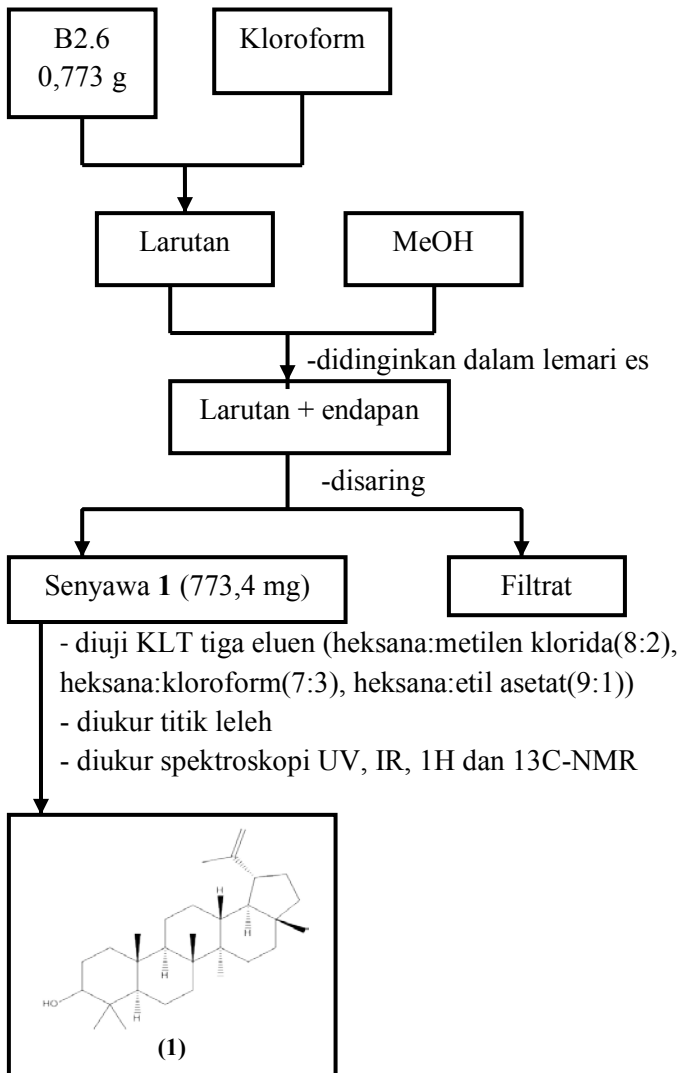
* = Peningkatan kepolaran 7,5; 30; 60; 100%

3. Skema Fraksinasi Fraksi B2

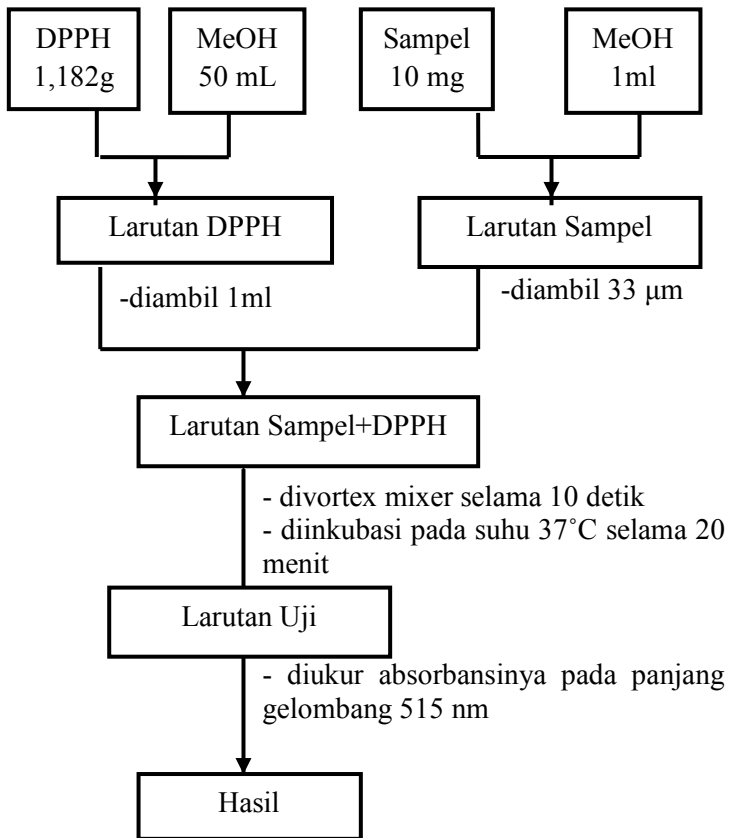


* = Peningkatan kepolaran 0; 1; 2; 4; 6; 8; 20; 40; 100%

4. Rekristalisasi Senyawa 1

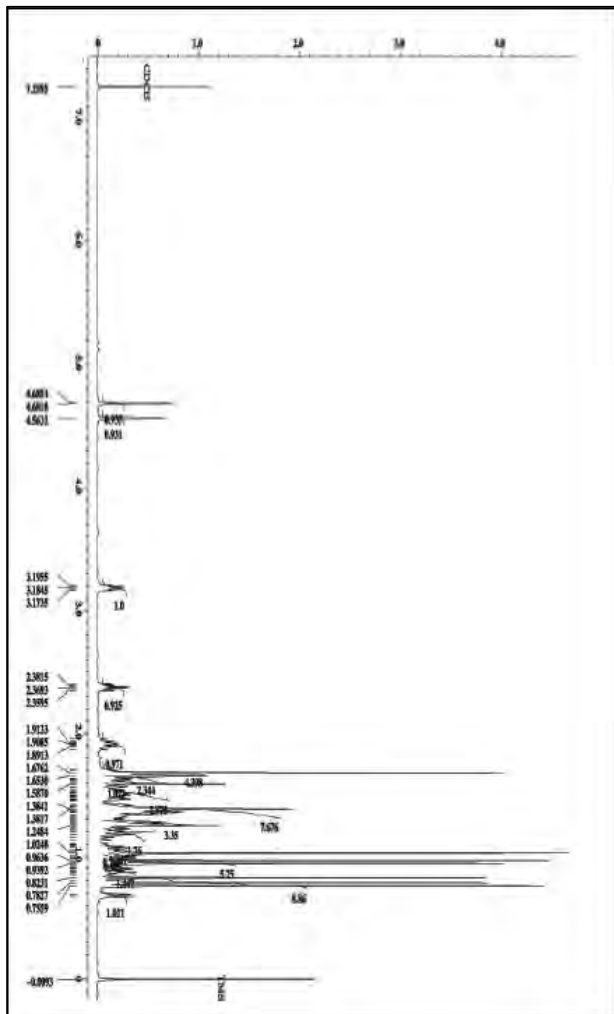


5. Uji Antioksidan terhadap Senyawa 1

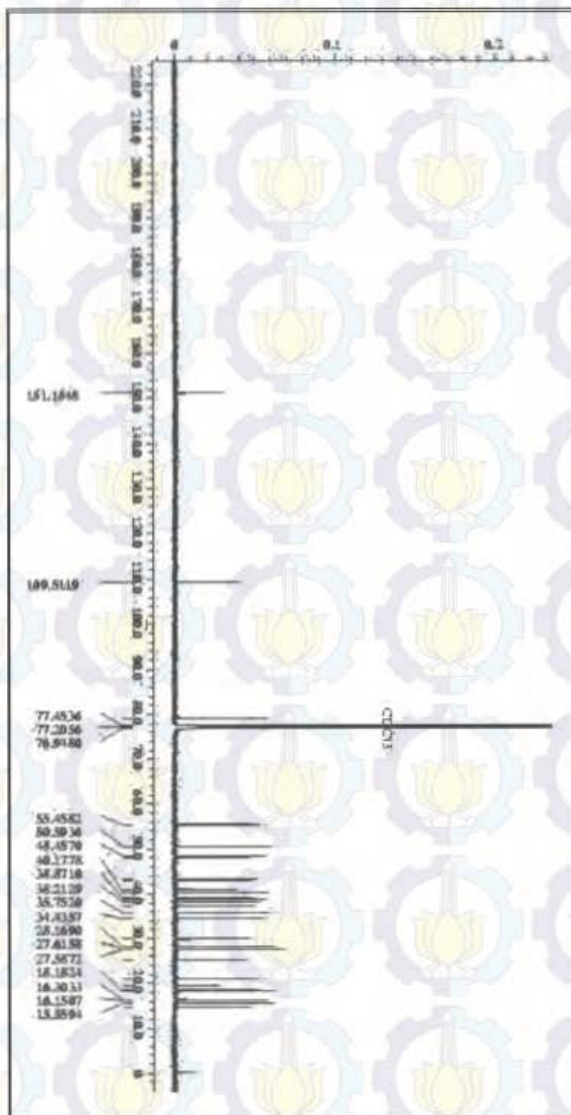


LAMPIRAN B
SPEKTRUM ^1H -NMR DAN ^{13}C -NMR

1. Spektrum ^1H -NMR Senyawa Pembanding (Lupeol)



2. Spektrum ^{13}C -NMR Senyawa Pembanding (Lupeol)



SURAT KETERANGAN

FROM : TN.BALURAN

Fax/ NO. : 0333463064

Jun. 24 2014 09:43 PM P1



KEMENTERIAN KEHUTANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERLINDUNGAN HUTAN DAN KONSERVASI ALAM
BALAI TAMAN NASIONAL BALURAN
 Jl. Raya Banyuwangi - Tuban Km. 31, Wanasari, Dlaty, Jember
 Situbondo - 68374, Telp. (0333) 451658 Fax. (0333) 453664
 Website : www.baluranationalpark.web.id E-mail : baluranationalpark@gmail.com

SURAT KETERANGAN No. S.00-BTN.BIZ.1-5/2014

Berdasarkan Surat Ijin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI) nomor S.369/BTN.Bir-1.3/2014 tanggal 13 Juni 2014 dan surat ketua jurusan kimia fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya nomor 303/IT.2.1.14/KS.00.00/2014 tanggal 8 Mei 2014, menerangkan

bahwa :

Nama : Uchik Nur Hidayatika
 Pekerjaan : Mahasiswa Institut Teknologi Sepuluh Nopember Oureksays
 Alamat : RT 04 RW 01 Kelurahan Kepakmaran Bani Tambaksari Surabaya

yang mengambil dan membawa keluar dari kawasan konservasi hutan nasional Baluran sebagai sampel untuk penelitian di Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya berupa specimen tumbuhan bagian kulit dan akar dengan spesifikasi jenis dan volume sampel sebagai berikut :

Nama daerah : Mundu alas
 Nama latin : *Garcinia balica*
 Bagian ranting : 5 Kg
 Bagian akar sebanyak : Kg

Dengan ketentuan :

1. Pengambilan specimen tumbuhan tidak terdapat di zona inti kawasan TN Baluran.
2. Specimen tumbuhan hanya diperkenankan untuk pengembangan penelitian dan ilmu pengetahuan.
3. Specimen tumbuhan tersebut tidak untuk kepentingan komersial.
4. Hasil penelitian terhadap specimen tumbuhan nggr nggrn dilaporkan kepada Kepala Balai TN Baluran

Demikian surat keterangan ini dibuat



Evy Endah Suwami, MSc
 NIP. 19611101 198603 2 001



BIODATA PENULIS

Penulis bernama Husna Elsaviaristi. Dilahirkan di kota Tulungagung, pada tanggal 1 Januari 1993. Merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan di TK Dharmawanita Ngranti. Lulus dari TK pada tahun 1999, penulis melanjutkan pendidikan di SDN Ngranti 1. Setelah itu menempuh pendidikan di SMPN 3 Tulungagung. Lulus dari SMP penulis menyelesaikan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Kauman. Pada tahun 2011, penulis diterima di ITS melalui jalur SNMPTN Undangan pada Jurusan Kimia FMIPA ITS dan terdaftar dengan NRP. 1411100039. Dijurusan kimia penulis mengambil bidang Kimia Organik. Selama menyelesaikan pendidikan di ITS, penulis juga aktif dalam berbagai organisasi mahasiswa. Diantaranya yaitu sebagai staf ahli Departemen PSDM BEM FMIPA ITS 2012/2013, sekretaris Departemen PSDM BEM FMIPA ITS 2013/2014, staf PSDM KOPMA ITS 2012/2013. Penulis dapat dihubungi di husna.elsa@yahoo.co.id.